



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112017013661-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 23/12/2015

**(45) Data de Concessão:** 19/12/2023

---

**(54) Título:** CONJUGADO DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO-FÁRMACO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

**(51) Int.Cl.:** A61P 35/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 23/12/2014 US 62/095,820.

**(73) Titular(es):** NBE-THERAPEUTICS AG.

**(72) Inventor(es):** ULF GRAWUNDER; ROGER RENZO BEERLI.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2015081183 de 23/12/2015

**(87) Publicação PCT:** WO 2016/102679 de 30/06/2016

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 23/06/2017

**(57) Resumo:** CONJUGADO DERIVADO DE ANTRACICLINA (PNU), CONJUGADO DE FÁRMACOPROTEÍNA DE LIGAÇÃO (BPDC), MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM CONJUGADO DE FÁRMACO-PROTEÍNA DE LIGAÇÃO (BPDC), USO DE UM CONJUGADO DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO-FÁRMACO (BPDC) E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção refere-se a um conjugado derivado de antraciclina (PNU) que compreende um derivado da antraciclina PNU-159682 tendo a fórmula (i) ou fórmula (ii) que adicionalmente compreende uma estrutura de ligação X - L1 - L2 - L3 - Y (Figura 3A).

“CONJUGADO DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO-FÁRMACO E COMPOSIÇÃO  
FARMACÊUTICA”

[001] A presente invenção refere-se a um conjugado de proteína de ligação-fármacos que compreende derivados de toxina antraciclina.

#### Introdução

[002] Conjugados covalentes de toxinas de baixo peso molecular (peso molecular preferivelmente < 2'500 daltons) a proteínas de ligação, em particular a anticorpos específicos para células de tumor, são ferramentas potentes para especificamente células alvo de câncer para a destruição das mesmas. Portanto, o referido conjugado de proteína de ligação-fármacos (BPDCs), particularmente conjugados de anticorpo fármaco (ADCs), são de grande interesse médico e comercial para a terapia de câncer. De modo a desenvolver BPDCs ou ADCs eficazes e seguros para terapia de câncer, diversos aspectos precisam ser considerados: primeiro, a proteína de ligação ou anticorpo precisa ser específico para um determinado antígeno específico a tumor (TSA), que deve dificilmente ou de modo ideal não ser expresso por células de tecido normal ou saudável. Segundo, a ligação covalente, ou ligação, entre o fármaco e a proteína de ligação precisa ter a funcionalidade para ser estável o suficiente em circulação, o que evita a liberação indesejada da carga útil tóxica na corrente sanguínea, mas ela tem que efetivamente liberar o fármaco com a ligação a e/ou a internalização nas células de câncer. Terceiro, a carga útil tóxica tem que ser de toxicidade suficientemente alta, ou potência, de modo a efetuar a destruição das células de câncer, mesmo se quantidades potencialmente limitadas de TSA são expressas nas células de câncer e, portanto, apenas quantidades limitadas de ADC são internalizadas, ou se a liberação da carga útil tóxica não é efetuada em uma eficiência suficientemente alta com a ligação às células de câncer, ou com a internalização dentro da célula de câncer.

[003] Embora o primeiro aspecto de objetivar com sucesso o câncer por meio de TSA depende do profundo entendimento da biologia do alvo e da objetivação

das moléculas desenvolvidas para a sua ligação específica, os segundo e terceiro aspectos, relacionados ao ligante ótimo e à carga útil de toxina, em geral se aplica à eficácia de conjugado de proteína de ligação-fármacos (BPDCs) ou conjugados de anticorpo fármaco (ADCs).

[004] Todos os ADCs atualmente em testes clínicos, e os dois ADCs que são aprovados pelo FDA para tratamento de câncer, anti-CD30 ADC Adcetris® (brentuxumab-vedotin) oferecido pela Takeda, e anti-HER-2 ADC Kadcyla® (trastuzumab emtansine, ou T-DM1) oferecido pela Roche/Genentech (vide Perez et al. 2014), são gerados por conjugação química da carga útil tóxica que envolve a química de ligante de maleimida seja aos grupos amino principais de resíduos de lisina do anticorpo, ou aos grupos tiol livres, gerados por redução suave das pontes de dissulfeto intra cadeias do anticorpo. A conjugação química tem duas limitações: primeiro, foi observado que os ligantes com base em maleimida química são associados com uma indesejada instabilidade na presença de albumina do soro humano e assim leva a liberação de toxinas na circulação de pacientes tratados com ADCs contendo ligante de maleimida (vide Alley et al., 2008). Segundo, a clássica conjugação química por química de ligante de maleimida resulta em BPDCs ou ADCs heterogêneos, pelo fato de que a mesma não pode ser controlada a qual os grupos amino- ou tiol a conjugação ocorre. Portanto, a distribuição Gaussiana de número de fármacos covalentemente ligados por anticorpo é obtida, de modo que os ADCs conjugados têm uma proporção média de fármaco para anticorpo (DAR) que varia entre 3.5 e 4. Entretanto, conjugados individuais podem ter nenhum fármaco fixado (DAR = 0) ao anticorpo, ou até 8 fármacos fixados ao anticorpo (DAR = 8) em caso de conjugados de cisteína e ainda mais fármacos por anticorpo (> DAR 10) em caso de conjugados de lisina. ADCs clássicos quimicamente conjugados, portanto representam uma mistura heterogênea de diferentes moléculas que exibem diferentes propriedades funcionais (vide Panowski et al., 2014), que claramente é indesejável a partir de um ponto de vista regulatório em desenvolver ADCs para o tratamento de pacientes com câncer.

[005] Portanto, há uma necessidade comercial e médica de proporcionar ADCs ou BPDCs que sejam conjugados especificamente a campo, e assim são homogêneos com relação a proporção de fármaco para anticorpo.

[006] Adicionalmente, há uma necessidade comercial e médica de se proporcionar ADCs ou BPDCs com uma ligação mais estável de fármaco para proteína que seja mais estável na circulação sanguínea do que os conjugados tradicionais com base em química de ligante de maleimida.

[007] Ademais, há uma necessidade comercial e médica de se proporcionar ADCs ou BPDCs que tenham uma maior eficácia e menos efeitos colaterais do que os ADCs ou BPDCs atualmente no mercado.

#### Características gerais da invenção

[008] A presente invenção resolve os referidos problemas. A mesma proporciona agora toxinas para uso em conjugados de proteína de ligação-fármaco, mais opcionalmente uma nova tecnologia para conjugar as referidas toxinas às referidas proteínas de ligação em um modo específico de campo por evitar a clássica química de ligante de maleimida.

[009] As vantagens gerais das referidas duas características serão discutidas no a seguir:

#### Tecnologia de Ligante

[010] Não só a instabilidade do soro acima mencionada mas também a heterogeneidade de quimicamente conjugado, e BPDCs ou ADCs contendo ligante de maleimida representam significantes responsabilidades para a segurança dos referidos fármacos em pacientes com câncer, pelo fato de que ambos acrescentam à liberação não específica da toxina ("de-entorpecer") dos referidos ADCs em pacientes.

[011] Por um lado, os clássicos ligantes de maleimida pode ser rompidos por tióis livres no soro humano, em particular cisteína-34 de albumina do soro humano, a qual – como a proteína do soro mais abundante - proporciona a mais alta concentração de tióis livres no soro humano. Cisteína-34 de albumina do soro humano

pode romper a ligação tioéter de ligantes de maleimida por meio da assim chamada reação de retro-Michael com a qual a toxina é transferida e covalentemente acoplada à albumina do soro humano (HSA). Um conjugado de toxina-HSA pode então distribuir a toxina na circulação ou no corpo sem qualquer seletividade de tumor (vide: Alley et al., 2008).

[012] Por outro lado, as maiores espécies DAR nos ADCs heterogêneos quimicamente conjugados são conhecidas por ter meias vidas mais curtas no soro em virtude de uma maior hidrofobicidade dos referidos ADCs e a propensão para agregação. Portanto as referidas maiores espécies DAR são sujeitas a uma depuração mais rápida a partir do soro, degradação e liberação da toxina antes da ligação dos referidos ADC às células de câncer positivas alvo. Adicionalmente, maiores espécies DAR são também conhecidas por levar a um de-entorpecimento mais rápido, pelo fato de que os campos de conjugação individuais têm diferentes cinéticas de de-entorpecimento, dependendo do contexto estrutural do amino ácido que porta a toxina.

[013] As responsabilidades acima mencionadas dos ADCs quimicamente conjugados impediram o sucesso do desenvolvimento dos ADCs na clínica, apesar do fato de que o conceito de enviar uma toxina celular altamente potente para as células de câncer por meio do seu acoplamento a um anticorpo específico a célula de tumor é interessante. Em virtude dos efeitos laterais relacionados a toxina o primeiro ADC que foi aprovado pela FDA em 2000, Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicin) oferecido pela Pfizer/Wyeth, precisou ser retirado do mercado 10 anos após a aprovação da FDA (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm216448.htm>).

[014] As responsabilidades dos ADCs quimicamente conjugados, portanto restringem os esforços de desenvolvimento do ADC atual em toxinas com toxicidade celular intermediária, tal como, por exemplo, a polimerização de tubulina inibindo os fármacos com base em dolastatina/auristatina e com base em maytansine. De fato, mais do que 90% de todos os ADCs atualmente em avaliação clínica portam toxinas relacionadas a monometil auristatin E (MMAE) ou F (MMAF) ou a maytansine (por exemplo, DM1 ou DM4) (vide: Mullard (2013))

[015] Entretanto, os fármacos que inibem a polimerização da tubulina não podem alcançar potências abaixo da faixa nanomolar, pelo fato de que a tubulina, um componente do citoesqueleto celular, é uma proteína alvo intracelular altamente abundante, de modo que muitas moléculas de fármaco precisam se difundir ou ser transportadas para dentro da célula, de modo a interromper o metabolismo do citoesqueleto intracelular, necessário para a divisão e sobrevivência celular. A potência intermediária dos fármacos que inibem a polimerização da tubulina, que pode tolerar um determinado grau de "de-entorpecimento" dos conjugados, e de suas ações específicas nas células em divisão e mitóticas tem tornado as toxinas com esse modo particular de ação mais populares para o desenvolvimento de ADCs.

[016] Entretanto, de modo a especificamente ir de encontro aos tumores com baixo nível de expressão de TSAs, toxinas muito mais potentes serão necessárias. Portanto, novas estratégias de ADC, ainda em desenvolvimento pré-clínico envolvem toxinas com alta toxicidade celular e diferentes modos de ações, em particular toxinas que danificam DNA, tais como duocarmicinas (vide: Doktor et al. (2014) e pirrolobenzodiazepinas (PBDs) (vide: Hartley & Hochhauser (2012)).

Derivados de antraciclinas

[017] Uma classe altamente interessante de toxinas de intercalação de DNA para uso as cargas úteis para BPDCs ou ADCs são antraciclinas, em virtude de sua validação clínica provada como fármacos quimioterapêuticos em terapia de câncer (vide: Minotti (2004)) Antraciclinas são os policetídeos de coloração vermelha com alta atividade antitumor, originalmente derivado a partir da espécie *Streptomyces*. Muitos derivados têm sido descritos durante os últimos 40 anos, incluindo alguns que são rotineiramente usados como fármaco quimioterápico para os vários cânceres sólidos e hematológicos, por exemplo, doxorubicina (também chamado adriamicina), daunorubicina, epirubicina, idarubicina ou valrubicina. Há ainda um ADC anti-CD74 em fase I/II de testes clínicos para mieloma múltiplo e outros cânceres hematológicos com doxorubicina como a carga útil tóxica, milatuzmab-doxorubicina (vide: [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) identifier:

NCT01101594.

[018] Todos os fármacos quimioterapêuticos com base em antraciclina são conhecidos por mostrar uma potência limitada nas células de tumor como fármacos livres com IC50s na faixa de  $\mu\text{mol/mL}$  na maioria das células de tumor (Crooke e Prestayko, 1981). Apesar do exemplo de uma primeira doxorubina-ADC atualmente avaliada em testes clínicos, o uso de antraciclinas convencionais como carga útil tóxica para as estratégias de ADC é provável que continue um desafio.

[019] Cerca de uma década atrás, um novo derivado de antraciclina, chamado PNU-159682, foi descrito como um metabólito de nemorubicina (vide: Quintieri et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11, 1608-1617), que foi recentemente reportada por exibir uma potência extremamente alta para o extermínio celular in vitro na faixa de pico- para femtomolar com uma linhagem celular de câncer de ovário (A2780) e um câncer de mama (MCF7) (WO 2012/073217 A1, Caruso et al.). A estrutura do derivado de antraciclina PNU-159682, como descrito nos documentos da técnica anterior acima mencionados é descrita na figura 2 com o objetivo de referência, e com o sistema de numeração oficial de antraciclina para os carbonos reativos da estrutura aglicona tetracíclica.

[020] Com base nas limitações acima mencionadas dos ADCs quimicamente conjugados, com relação a instabilidade de ligante de maleimida e de entorpecimento de espécies maiores de DAR em ADCs heterogêneos quimicamente conjugados, uma toxina de antraciclina altamente potente, tal como a PNU-159682, é esperada ser altamente problemática no contexto da clássica conjugação química, em virtude da liberação da toxina em circulação antes de objetivar as células de tumor.

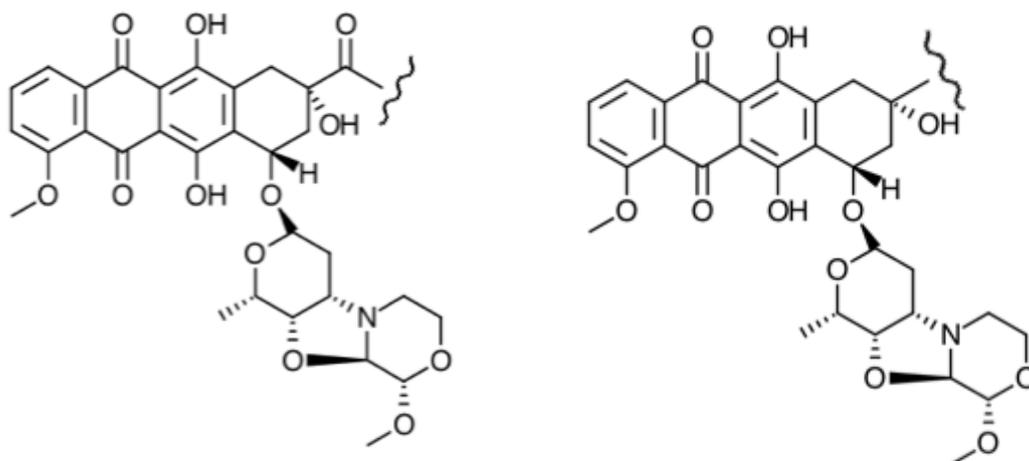
[021] Portanto, toxinas potentes como, por exemplo, ADCs homogêneos PNU-159682, com definidas propriedades farmacocinéticas e estabilidade estendida do soro são necessárias, de modo a evitar, ou a minimizar os efeitos colaterais a partir das toxinas prematuramente liberadas na circulação de pacientes. Entretanto, ao mesmo tempo, o extermínio específico de células de tumor caracterizado por uma baixa expressão no alvo ainda precisa ser possível.

[022] Embora o uso de PNU-159682 como uma carga útil para ADCs gerados pela clássica abordagem química de ligante de maleimida foi descrita antes (WO 2009/099741 A1, Cohen et al.), nenhum dado funcional foi proporcionado nesse documento da técnica anterior. O primeiro dado funcional com PNU-159682 ligado a anticorpos com diferentes estruturas de ligante e espaçador no contexto de conjugados contendo ligante maleimida quimicamente conjugado e heterogêneo em células de tumor foram descritas no documento da técnica anterior WO 2010/009124 A2 (Beria et al.), mas dados de segurança e de farmacocinética não foram proporcionados.

#### Modalidades preferidas

[023] De acordo com uma primeira modalidade preferida, conjugados derivados de antraciclina (PNU) são descritos que contêm derivados de PNU-159682 desprovidos de carbono C14 e grupo hidroxila fixado da estrutura aglicona tetracíclica característica para antraciclina. Como a segunda modalidade preferida conjugados derivados de antraciclina (PNU) são descritos desprovidos não só de carbono C13 e carbono C14 com função carbonila em C13 mas também de grupo hidroxila em C14 da estrutura aglicona tetracíclica característica para antraciclina.

[024] Nas referidas modalidades, os conjugados derivados de antraciclina (PNU) compreende um derivado da antraciclina PNU-159682 tendo a fórmula (i) ou fórmula (ii) a seguir:



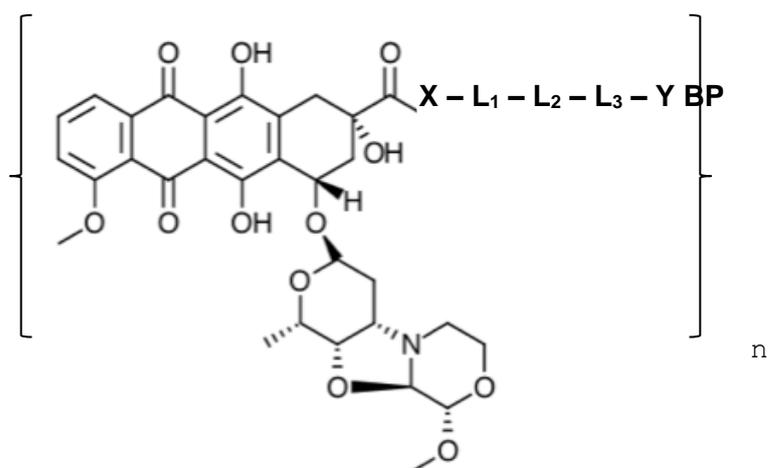
[025] Estrutura de ligação que pode ter diferentes elementos, X – L1 – L2 – L3 – Y, em que L1 - L3 representam ligantes, e dois de L1 – L3 são opcionais, e em que X e Y adicionalmente representam cada um ou mais ligantes opcionais.

[026] Ambos os derivados são marcadamente diferentes de PNU-159682, que é um metabólito da antraciclina nemorubicina e foi pela primeira vez descrita por Quintieri et al. (2005).

[027] Ambos os carbonos C13 e C14 com as suas funções carbonila em C13 e o grupo hidroxila em C14 são a característica estrutural obrigatória de PNU-159682, que não são parte dos derivados conjugados descritos aqui.

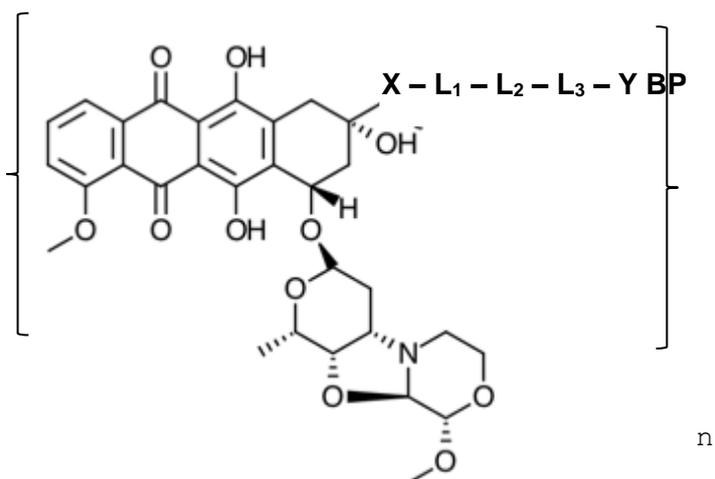
[028] Surpreendentemente, e pela primeira vez, é demonstrado que os derivados de PNU sem carbono 14 e grupo hidroxila fixado da estrutura aglicona tetracíclica característica para antraciclina exibem toxicidade celular, por exemplo, em conjugados de anticorpo fármaco conjugados especificamente a campo. Modalidades preferidas do mesmo são mostradas nas figuras 3A, 6A e 6B.

[029] De acordo com outra modalidade da presente invenção, um conjugado de fármaco-proteína de ligação (BPDC) é proporcionado, tendo a fórmula a seguir:



Fórmula (iii)

ou



Fórmula (iv)

[030] em que L1 - L3 representa ligantes, e dois de L1 – L3 são obrigatórios,

[031] em que X e Y representam cada um dos quais um ou mais ligantes opcionais,

[032] em que BP é uma proteína de ligação, e

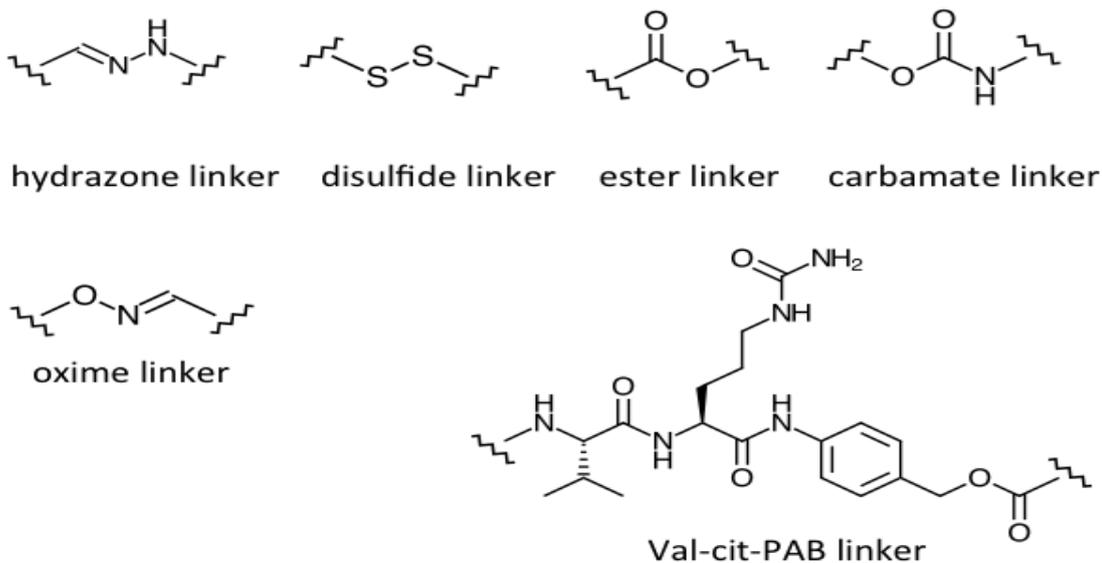
[033] em que n é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 10$ .

[034] No referido construtor, diversos ligantes podem formar uma cadeia unitária que conjuga uma toxina a uma proteína de ligação, e/ou diversos ligantes

podem conectar diversas toxinas a uma proteína de ligação. Da mesma forma, os ligantes podem conjugar duas ou mais subunidades da mesma proteína de ligação a duas ou mais moléculas de toxina.

[035] Os ligantes opcionais X podem ser qualquer estrutura de ligação química conhecida na técnica anterior, que foi usada em ADCs para permitir a liberação específica da toxina com a internalização dentro das células de câncer (vide, por exemplo, Ducry & Stump (2010) ou McCombs et al. (2015)

[036] Alguns exemplos para os referidos ligantes descritos na técnica anterior, que são apenas proporcionados por meio de exemplo e não pretendidos serem limitantes, são mostrados abaixo.



[037] Legendas

ligante de hidrazona      ligante de dissulfeto      ligante de éster  
 ligante de carbamato      ligante de oxima      ligante Val-Cit-PAB

[038] Os ligantes L1, L2 e L3 são discutidos abaixo.

[039] Os ligantes opcionais Y podem ser qualquer cadeia de amino ácidos com até 20 amino ácidos permitindo uma ótima conjugação da proteína de ligação à cadeia unitária de ligantes X, L1, L2, L3 ou variações dos mesmos, em particular a L3.

[040] Adicionalmente, estruturas de ligação são proporcionadas, as

quais permitem a conjugação específica de campo dos derivados de PNU a proteínas de ligação adequadas, por exemplo, e preferivelmente a anticorpos. Os derivados podem assim ser usados para produzir conjugado específico de campo, conjugados homogêneos de proteína de ligação-fármaco, que podem ser usados em aplicações terapêuticas, tais como terapia anticâncer.

[041] De acordo com outra modalidade preferida do derivado de antraciclina (PNU), a estrutura de ligação compreende, como L2, um peptídeo de oligo-glicina (Glin) acoplado ao referido derivado de antraciclina, diretamente ou por meio de outro ligante L1, de tal modo que o peptídeo de oligo-glicina (Glin) tem um amino término livre, e em que  $n$  é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 21$ .

[042] Em cada caso (Gli) $n$  (também chamado (Gli) $n$ -NH<sub>2</sub> ou Extensão Glin aqui) é a um peptídeo de extensão oligo-glicina. Em uma modalidade particularmente preferida,  $n$  é um número inteiro entre  $\geq 3$  e  $\leq 10$ , preferivelmente  $\geq 3$  e  $\leq 6$ . Ainda mais preferido,  $n = 5$ .

[043] Como já descrito aqui, os derivados de antraciclina (PNU)s descrito aqui são derivados de PNU-159682 seja desprovidos átomos de carbono 13 e 14 ou desprovidos apenas de carbono 14 com grupos funcionais fixados.

[044] Com relação a fórmula (i), a mesma é uma modalidade preferida na qual o peptídeo de oligo-glicina (Gli) $n$  ( $\geq 1$  e  $\leq 21$ , preferivelmente  $n = 3$  ou  $n = 5$ ) é conjugado ao derivado de antraciclina por meio de um ligante alquilenodiamino (NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>) $m$ -NH<sub>2</sub>,  $m \geq 1$  e  $\leq 11$ , preferivelmente  $m = 2$ ), que é conjugado ao derivado de antraciclina por meio de uma primeira ligação amida ao carbono 13 e conjugado ao carboxitérmino do peptídeo de oligo-glicina por meio de uma segunda ligação amida. O composto preferido, PNU-EDA-Gli5, útil para gerar os conjugados derivados de antraciclina (PNU) conjugado específico de campo é ilustrado na figura 3A.

[045] Com relação a fórmula (ii), a mesma é uma modalidade preferida na qual o peptídeo de oligo-glicina (Gli) $n$  ( $\geq 1$  e  $\leq 21$ , preferivelmente  $n = 3$  ou  $n = 5$ ) é diretamente acoplado ao anel A do derivado de PNU (ou carbono 9 da estrutura

aglicona antraciclina), de modo que o grupo carbonila de carbono 13 representa a extremidade carbóxi do peptídeo ligante de glicina. O composto preferido, PNU-Gli5, útil para gerar conjugados derivados de antraciclina (PNU) conjugado específico de campo é ilustrado na figura 6A.

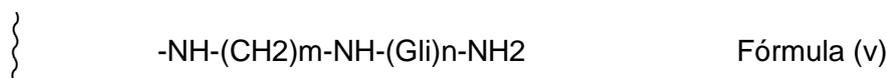
[046] Com relação a fórmula (ii), a mesma é outra modalidade preferida na qual o peptídeo de oligo-glicina (Gli)<sub>n</sub> ( $n \geq 1$  e  $\leq 21$ , preferivelmente  $n = 3$  ou  $n = 5$ ) é conjugado diretamente ao anel A do derivado de PNU (ou carbono 9 da estrutura aglicona antraciclina), com um ligante alquilenamina  $-(CH_2)_m-NH_2$ ,  $m \geq 1$  e  $\leq 11$ , preferivelmente  $m = 2$ ) que é conjugado ao carboxitérmino do peptídeo de oligo-glicina por meio de uma ligação amida. O composto preferido, PNU-EA-Gli5 útil para gerar conjugados derivados de PNU de conjugado específico de campo é ilustrado na figura 6B.

[047] No a seguir, o derivado de antraciclina conjugado de acordo com a descrição acima é também chamado "PNU-EDA-Glin-NH<sub>2</sub>", "PNU-Glin-NH<sub>2</sub>" ou "PNU-EA-Glin-NH<sub>2</sub>", ou abreviando também "PNU-EDA-Glin", "PNU-Glin", ou "PNU-EA-Glin", respectivamente, ou em sua modalidade preferida com 5 resíduos de glicina, "PNU-EDA-Gli5", "PNU-Gli5", ou "PNU-EA-Gli5", respectivamente.

[048] A presente invenção adicionalmente proporciona um conjugado de fármaco-proteína de ligação (BPDC), que compreende um derivado de antraciclina conjugado de acordo com a descrição acima, cujo derivado adicionalmente compreende uma proteína de ligação conjugada ao amino término livre do peptídeo de oligo-glicina (Glin) por meio de uma ligação amida adicional.

[049] De acordo com outra modalidade do derivado de antraciclina (PNU) ou do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), o peptídeo de oligo-glicina (Glin), designado como L2, é conjugado ao derivado de antraciclina de fórmula (i) por meio de um ligante alquilenodiamino, designado como L1, cujo ligante alquilenodiamino é conjugado ao derivado de antraciclina por meio de uma primeira ligação amida, enquanto o mesmo é conjugado ao carbóxi término do peptídeo de oligo-glicina por meio de a segunda ligação amida, o referido conjugado de ligante alquilenodiamino e peptídeo de

oligo-glicina tendo a fórmula a seguir (v),



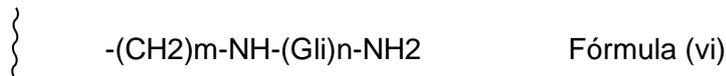
[050] em que a linha ondulada indica a ligação ao derivado de antraciclina de fórmula (i).

[051] m é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 11$ , e n é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 21$ . Preferivelmente, m é um número inteiro entre  $\geq 2$  e  $\leq 4$ , ainda mais preferivelmente  $m = 2$  (grupo etilenodiamino, EDA).

[052] O ligante alquilenodiamino é usado para permitir a fixação do ligante (Gli)<sub>n</sub> para a conjugação da sortase, de modo que o acoplamento pode ocorrer via o C-término do peptídeo (Gli)<sub>n</sub>, assim proporcionando um N-término livre do aduto de toxina-ligante final para a conjugação da sortase. Deve ser entendido que qualquer grupo metileno CH<sub>2</sub> no ligante alquilenodiamino pode ser substituído por outra ligação estável, por exemplo, um -O- (éter), -S- (tioéter), -NH- (amina), ou qualquer outro grupo alquila, hetero-alquila, arila ou hetero-arila, ou qualquer combinação dos mesmos, de modo a realizar a presente invenção.

[053] De acordo com outra modalidade do derivado de antraciclina (PNU) ou do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), o peptídeo de oligo-glicina (Glin) é diretamente acoplado ao anel A (ou carbono 9) do derivado de antraciclina de fórmula (ii). Vide a figura 6A para uma ilustração do mesmo.

[054] De acordo com outra modalidade do derivado de antraciclina (PNU) ou do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), o peptídeo de oligo-glicina (Glin) é conjugado ao derivado de antraciclina de fórmula (ii) por meio de um ligante alquilenamino, designado como L1, cujo ligante alquilenamino é conjugado ao carbóxi término do peptídeo de oligo-glicina por meio de uma ligação amida, o referido conjugado de ligante alquilenamino e peptídeo de oligo-glicina tendo a fórmula a seguir (vi)



[055] em que a linha ondulada indica a ligação ao derivado de antraciclina de fórmula (ii), em que  $m$  é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 11$ , e  $n$  é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 11$ . Preferivelmente,  $m$  é um número inteiro entre  $\geq 2$  e  $\leq 4$ , ainda mais preferivelmente  $m = 2$  (grupo etilenoamino, EA).

[056] O ligante alquilenamino é usado para permitir a fixação do ligante (Gli) $_n$  para a conjugação da sortase, de modo que o acoplamento pode ocorrer por meio do C-término do peptídeo (Gli) $_n$ , assim proporcionando um N-término livre do aduto de toxina-ligante final para a conjugação da sortase. Deve ser entendido que qualquer grupo metileno CH<sub>2</sub> no ligante alquilenamino pode ser substituído por outra ligação estável, por exemplo, um -O- (éter), -S- (tioéter), -NH- (amina), ou qualquer outro grupo alquila, hetero-alquila, arila ou hetero-arila, ou qualquer combinação dos mesmos, de modo a realizar a presente invenção.

[057] Em outra modalidade do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), a estrutura de ligação L3 compreende um motivo de peptídeo que resulta a partir de clivagem específica de um motivo de reconhecimento de enzima sortase.

[058] Como descrito em algum ponto aqui assim como no pedido de patente internacional publicado sob o No. WO 2014140317, o conteúdo da qual é aqui incorporado por referência, as sortases (também chamadas de sortase transpeptidases) formam um grupo de enzimas procarióticas que modificam as proteínas da superfície por reconhecer e clivar um sinal de classificação específico que compreende um motivo de peptídeo particular. O referido motivo de peptídeo é também chamado "motivo de reconhecimento de enzima sortase", "tag de sortase" ou "tag de reconhecimento de sortase" aqui. Em geral, uma determinada enzima sortase tem um ou mais motivos de reconhecimento de enzima sortase que são reconhecidos. As enzimas sortase podem ser de ocorrência natural, ou podem ter passado por engenharia genética (Doerr et al., 2014).

[059] Em uma modalidade preferida do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), o referido motivo de reconhecimento de enzima sortase compreende um pentapeptídeo.

[060] Em uma modalidade preferida do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), o referido motivo de reconhecimento de enzima sortase compreende pelo menos uma das sequências de amino ácido a seguir (mostradas N-término -> C-término):

LPXTG

LPXSG, e/ou

LAXTG.

[061] Os primeiros dois motivos de reconhecimento de enzima sortase são reconhecidos pela sortase A de tipo selvagem *Staphylococcus aureus* sortase A. O segundo é também reconhecido por sortase A 4S9 que sofreu engenharia genética a partir de *Staphylococcus aureus*, e o terceiro é reconhecido por sortase A 2A-9 que sofreu engenharia genética a partir de *Staphylococcus aureus* (Doerr et al, 2014). Em todos os três casos, X pode ser qualquer um dos 20 amino ácidos peptidogênicos.

[062] Os referidos motivos de reconhecimento de enzima sortase são, por exemplo, fundidos ao C-término de uma proteína de ligação, ou ao domínio ou subunidade da mesma, por fusão genética, e são co-expressos com a mesma. A referida fusão pode ser realizada diretamente, ou indiretamente, por meio de um ligante Y adicional descrito em algum ponto aqui.

[063] É interessante observar que, uma vez integrados em uma estrutura de ligação e conjugado a L2, L3 é desprovido do 5th resíduo de amino ácido (C-terminal G) dos motivos de reconhecimento de enzima sortase. Na tabela 1, o referido C-terminal G é assim mostrado em parêntese. Em caso do motivo de reconhecimento de enzima sortase é um pentapeptídeo, L3 é assim a tetrapeptídeo.

[064] Antes da conjugação da sortase, os motivos de reconhecimento de enzima sortase podem adicionalmente portar outras etiquetas, tais como His-etiquetas,

Myc-etiquetas ou Strep-etiquetas (vide a figura 4a de WO 2014140317, o conteúdo da qual se encontra aqui incorporado por referência), C-terminal fundido aos motivos de reconhecimento de enzima sortase. Entretanto, pelo fato de a ligação de peptídeo entre o 4° e o 5° amino ácido do motivo de reconhecimento de enzima sortase ser clivado com a conjugação mediada a sortase, as referidas etiquetas adicionais serão eventualmente removidas a partir do completo conjugado BPDC.

[065] Os motivos de reconhecimento de enzima sortase podem ser conjugados ao ligante (Gli)n que é conjugado ao derivado de antraciclina por meio da tecnologia de sortase descrita aqui e em WO 2014140317. Durante o processo de conjugação, um residuo de glicina a partir do ligante (Gli)n é liberado.

[066] É digno de nota mencionar que, embora as referidas tres extensões de peptídeo sejam mostradas acima na clássica direcao de N-término -> C-término, que o residuo L é um que é fundido ao C-término da proteína de ligação, ou ao C-término do ligante Y, por meio da ligação de peptídeo. O 5° residuo de amino ácido (G) de L3 é removido com a conjugação ao peptídeo (Gli)n, enquanto o 4° residuo de amino ácido T ou S de L3 é um que é atualmente conjugado ao N-término do peptídeo (Gli)n.

[067] A tabela a seguir assim proporciona uma visão geral das modalidades preferidas do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) da presente invenção, com L1 – L3 mostradas.

Toxina	L1	L2	L3 (mostrado aqui C'-> N')	Proteína de ligação
Fórmula (i)	Grupo alquilenodiamino	(Gli)n	(G)TXPL (G)SXPL (G)TXAL	Anticorpo
Fórmula (ii)	Grupo alquilenamino grupo	(Gli)n	(G)TXPL (G)SXPL (G)TXAL	Anticorpo

Tabela 1: estruturas de ligação típicas

[068] Como discutido, é interessante observar que, uma vez integrado na estrutura de ligação e conjugado a L2, L3 é desprovido do 5º resíduo de amino ácido (C-terminal G). Na tabela 1, o referido C-terminal G é assim mostrado em parêntese.

[069] De acordo com outra modalidade do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), o derivado de antraciclina (PNU) é conjugado, por meio de um ou mais ligantes, ao carbóxi término da proteína de ligação, ou ao carbóxi término de um domínio ou subunidade do mesmo.

[070] Em outra modalidade preferida, n no ligante de peptídeo de oligo-glicina (Glin) é um número inteiro entre  $\geq 3$  e  $\leq 11$ , mais preferivelmente entre  $\geq 3$  e  $\leq 7$ , preferivelmente  $n = 3$ , ou  $n = 5$ . Ainda mais preferivelmente, n no ligante peptídeo de oligo-glicina (Glin) é 5.

[071] Em uma modalidade preferida, a carga útil é uma de fórmula (i).

[072] Em uma segunda modalidade preferida, a carga útil é uma de fórmula (ii).

[073] De acordo com outra modalidade do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), a proteína de ligação é conjugado ao amino término livre do peptídeo de oligo-glicina (Glin) por meio de uma ligação amida.

[074] De acordo com outra modalidade do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), a proteína de ligação é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste de um

[075] anticorpo,

[076] formato de anticorpo modificado,

[077] derivado ou fragmento de anticorpo que retém propriedades de ligação alvo

[078] proteína de ligação com base em anticorpo,

[079] ligante de oligopeptídeo e/ou

[080] um anticorpo mimético.

[081] O termo “proteína de ligação”, como usado aqui, é equivalente ao termo “imunoligante” como usado em outras publicações pelos inventores, incluindo o apêndice 1, que proporciona detalhes técnicos adicionais, divulgação e capacitação no que se refere a tecnologia de conjugação de enzima sortase.

[082] "Anticorpos", também chamado de "imunoglobulinas" (Ig), em geral compreendem quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), e são portanto proteínas multiméricas, ou um homólogo equivalente de Ig do mesmo (por exemplo, um nanocorpo de camelídeo, que compreende apenas um anticorpo de domínio único de cadeia pesada (dAbs) que pode ou ser derivado a partir de uma cadeia pesada ou leve); incluindo mutantes funcionais de comprimento total, variantes, ou derivados dos mesmos (incluindo, mas não limitado a anticorpos de murino, quimérico, humanizado e completamente humano, que retém as características de ligação a epítopo essencial de uma molécula de Ig, e incluindo domínios imunoglobulina dual específico, biespecífico, multiespecífico, e dual variável; moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer classe (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2) e alotipo.

[083] Desde que a proteína de ligação seja um anticorpo, o fármaco conjugado de proteína de ligação é um conjugado de anticorpo fármaco (ADC).

[084] No a seguir, os ADCs de acordo com a presente invenção são também chamados “PNU-EDA-Glin-Ab”, “PNU-Glin-Ab” ou “PNU-EA-Glin-Ab”.

[085] Uma "proteína de ligação com base em anticorpo", como usado aqui, pode representar qualquer proteína que contém pelo menos um anticorpo-derivado VH, VL, ou domínio de imunoglobulina CH no contexto de outros componentes derivados de não imunoglobulina, ou de não anticorpo. As referidas proteínas com base em anticorpo incluem, mas não são limitadas a (i) proteínas de fusão Fc de proteínas de ligação, incluindo receptores ou componentes de receptor com todos ou partes dos domínios de imunoglobulina CH, (ii) proteínas de ligação, nas quais os domínios VH e ou VL são acoplados a alternative andaimes moleculares, ou (iii) moléculas, nas quais as

imunoglobulina VH, e/ou VL, e/ou CH domínios são combinados e/ou montados em um modo não normalmente encontrado nos anticorpos ou em fragmentos de anticorpo de ocorrência natural.

[086] Um "derivado ou fragmento de anticorpo", como usado aqui, refere-se a uma molécula que compreende pelo menos uma cadeia de polipeptídeo derivada a partir de um anticorpo que não é de comprimento total, incluindo, mas não limitado a (i) um fragmento Fab, que é um fragmento monovalente que consiste dos domínios leve variável (VL), pesado variável (VH), leve constante (CL) e pesado constante 1 (CH1); (ii) um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que é um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobra; (iii) uma porção de cadeia pesada de um fragmento Fab (Fd), que consiste dos dominós VH e CH1; (iv) um fragmento de fragmento variável (Fv), que consiste dos dominós VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento de domínio de anticorpo (dAb), que compreende um único domínio variável; (vi) uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR); (vii) um fragmento Fv de cadeia única (scFv); (viii) um diacorpo, que é um anticorpo bivalente, biespecífico no qual os domínios VH e VL são expressos em uma única cadeia de polipeptídeo, mas usando um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, desse modo forçando os domínios a parearem com os domínios de complementaridade de outra cadeia e criando dois campos de ligação a antígeno; e (ix) um anticorpo linear, que compreende um par de segmentos Fv em balanço (VH-CH1-VH-CH1) os quais, junto com os polipeptídeos de complementaridade de cadeia leve, formam um par de regiões de ligação a antígeno; e (x) outras porções de comprimento não total de imunoglobulina de cadeias pesada e/ou leve, ou mutantes, variantes, ou derivados das mesmas, isoladamente ou em qualquer combinação. Em qualquer caso, o referido derivado ou fragmento retém as propriedades de ligação alvo.

[087] O termo "formato de anticorpo modificado", como usado aqui, engloba conjugados de anticorpo-fármaco, scFv modificado a óxido de polialquileno, Monocorpos, Diacorpos, Anticorpos de camélídeo, Anticorpos de domínio, anticorpos bi-

ou trispecíficos, IgA, ou duas estruturas IgG unidas por uma cadeia J e um componente secretório, anticorpos de tubarão, framework de primata do novo mundo + CDR de primata de não novo mundo, anticorpos IgG4 com região de dobra removida, IgG com dois campos de ligação adicionais inseridos por engenharia genética nos domínios CH3, anticorpos com região Fc alterada para aumentar a afinidade para os receptores gama Fc, construtores dimerizados que compreendem CH3+VL+VH, e semelhante.

[088] O termo "anticorpo mimético", como usado aqui, se refere a proteínas que não pertencem à família das imunoglobulinas, e mesmo as não proteínas tais como aptâmeros, ou polímeros sintéticos. Alguns tipos têm uma estrutura laminar beta tal como um anticorpo. Vantagens potenciais de "anticorpos miméticos" ou "andaimes alternativos" sobre os anticorpos são melhor solubilidade, maior penetração em tecido, maior estabilidade em direção a calor e enzimas, e custos de produção comparativamente baixos.

[089] Alguns anticorpos miméticos podem ser proporcionados em grandes bibliotecas, que oferecem candidatos de ligação específicos contra cada alvo concebível. Da mesma forma que os anticorpos, anticorpos miméticos específicos de alvo podem ser desenvolvidos pelo uso de tecnologias de Leitura de Alta Produtividade "High Throughput Screening" (HTS) assim como com tecnologias de display estabelecidas, tal como phage display, bacterial display, levedura ou mamífero display. Os anticorpo miméticos atualmente desenvolvidos englobam, por exemplo, proteínas de repetição anquirina (chamado DARPin), lectinas do tipo C, proteínas de S. Aureus de domínio A, transferrinas, lipocalinas, domínios de fibronectina de 10th tipo III, inibidores de protease de domínio Kunitz, ligantes derivados de ubiquitina (chamados afillinas), ligantes derivados de gama cristalina, knots ou knottinas de cisteína, ligantes com base em andaime de tioredoxina A, domínios SH-3, estradocorpos, "domínios A" de receptores de membrana estabilizados por ligações dissulfeto e Ca<sup>2+</sup>, compostos com base em CTLA4, Fyn SH3, e aptâmeros (moléculas de peptídeo que se ligam a moléculas específicas de alvo).

[090] O termo "ligante de oligopeptídeo", como usado aqui, refere-se

a oligopeptídeos que têm a capacidade de se ligar, com alta afinidade, a um determinado alvo. O termo "oligo" se refere a peptídeos que têm entre 5 e 50 resíduos de amino ácidos.

[091] De acordo com outra modalidade do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC), a proteína de ligação se liga a pelo menos uma entidade selecionada a partir do grupo que consiste de

[092] um receptor

[093] um antígeno

[094] um fator de crescimento,

[095] uma citocina, e/ou

[096] um hormônio.

[097] A referida lista define os diferentes tipos de alvos aos quais a proteína de ligação pode se ligar. Como usado aqui, o termo "receptor" quer dizer uma molécula de superfície celular, preferivelmente uma molécula de superfície celular que (i) se liga a uma específica, ou grupos específicos de moléculas de sinalização (isto é, um receptor, tal como, por exemplo, o receptor VEGF), e/ou (ii) não tem ligante conhecido (isto é, um receptor órfão, tal como, por exemplo, HER2/neu). Os receptores naturais são expressos na superfície de uma população de células, ou os mesmos meramente representam o domínio extracelular da referida molécula (seja a referida forma existindo naturalmente ou não), ou uma molécula solúvel que realiza uma função de ligação natural no plasma, ou dentro de uma célula ou órgão. Preferivelmente, o referido receptor é um membro de uma cascata de sinalização que é envolvido em um processo patogênico particular (por exemplo, um receptor que pertence a uma cascata de sinalização de um fator de crescimento), ou é expresso na superfície da célula ou partícula que é envolvida em um processo patológico, por exemplo, uma célula de câncer.

[098] Como usado aqui, o termo "antígeno" quer dizer uma substância que tem a capacidade de induzir uma resposta imune específica, e pode incluir proteínas da superfície ou complexos proteicos (por exemplo, canais de íon). Muitas vezes, os antígenos são associados às entidades patogênicas, por exemplo, uma célula

de câncer.

[099] Como usado aqui, o termo "citocina" se refere a pequenas moléculas de proteína de sinalização de célula que são secretadas por numerosas células e são uma categoria de moléculas de sinalização usadas extensivamente em comunicação intercelular. As citocinas podem ser classificadas como proteínas, peptídeos ou glicoproteínas; o termo "citocina" engloba uma família grande e diversa de reguladores produzidos através do corpo por células de diversas origens embriológicas.

[100] Como usado aqui, o termo "fator de crescimento" refere-se a uma substância de ocorrência natural capaz de estimular o crescimento celular, proliferação e diferenciação celular. Em geral um fator de crescimento é uma proteína ou um hormônio esteroide. Fatores de crescimento são importantes para regular uma variedade de processos celulares.

[101] Como usado aqui, o termo "hormônio" refere-se a uma substância química liberada por uma célula, uma glândula, ou um órgão em uma parte do corpo que envia mensagens que afetam as células em outras partes do organismo. O termo engloba hormônios de peptídeo, hormônios derivados de lipídeo e fosfolipídeo incluindo os hormônios esteroides e as monoaminas.

[102] Em caso da proteína de ligação se ligar a um receptor ou a um antígeno, o conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) pode, por exemplo, ser direcionado a um campo específico, por exemplo, a uma entidade patogênica, por exemplo, uma célula de câncer, onde a carga útil, por exemplo, a toxina é enviada. Assim, a toxicidade sistêmica da toxina ou do agente quimioterapêutico é reduzida, enquanto a concentração local da última no campo de ação é aumentada, assim proporcionando uma melhor eficácia ao mesmo tempo em que os efeitos colaterais são reduzidos. Adicionalmente, a respectiva cascata de sinalização pode ser inibida pela ligação da proteína de ligação. No caso em que a carga útil seja um marcador a última pode assim ser usada para marcar um campo específico, por exemplo, uma célula de câncer caracterizada por um determinado antígeno de superfície detectado por uma proteína de

ligação, para diagnose.

[103] No caso da proteína de ligação se ligar a um fator de crescimento, uma citocina, e/ou um hormônio, o conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) pode, por exemplo, ser direcionado ao campo o fator de crescimento citocina ou hormônio em geral se liga, de modo a enviar a carga útil em um modo específico de campo. Ademais, a respectiva cascata de sinalização pode ser inibida pela ligação da proteína de ligação.

[104] Como usado aqui, o termo "se ligar" quer dizer a interação bem entendida ou outra associação não aleatória entre proteína de ligação, por exemplo, anticorpos, ou fragmentos de anticorpo e os seus alvos. Preferivelmente, a referida reação de ligação é caracterizada por alta especificidade e/ou sensibilidade ao alvo. Preferivelmente, a reação de ligação é caracterizada por uma constante de dissociação ( $K_d$ )  $\leq 10^{-3}$  M, preferivelmente  $\leq 10^{-4}$  M,  $\leq 10^{-5}$  M,  $\leq 10^{-6}$  M,  $\leq 10^{-7}$  M,  $\leq 10^{-8}$  M,  $\leq 10^{-9}$  M, e ainda mais preferido  $\leq 10^{-10}$ .

[105] De acordo com outra modalidade, a proteína de ligação tem pelo menos dois subunidades.

[106] Nessa modalidade, uma subunidade pode ser conjugada a um derivado da antraciclina PNU-159682 descrita aqui (vide as figuras 3A e 6A e 6B).

[107] Preferivelmente, pelo menos dois diferentes fármacos podem ser conjugados a pelo menos duas subunidades especificamente a campo. Essa opção proporciona uma caixa de ferramenta versátil com a qual uma grande variedade de diferentes construtores de proteína de ligação-fármaco pode ser criada.

[108] Preferivelmente, os pelo menos dois diferentes fármacos são fármacos que interferem com diferentes trajetos celulares. Isso quer dizer que, próximo ao derivado de antraciclina conjugado descrito aqui, a segunda toxina pode ser conjugada a outra subunidade da mesma proteína de ligação.

[109] A referida modalidade pode ser realizada, por exemplo, por conjugar os dois diferentes fármacos a cada 2 cadeias leves de um anticorpo de

comprimento total, e a 2 cadeias pesadas de um anticorpo de comprimento total, respectivamente, por utilizar duas diferentes enzimas sortase, que reconhecem diferentes motivos de reconhecimento de sortase (“etiquetas de sortase”), mais um anticorpo que contém diferentes modificações C-terminais nas cadeias pesada e leve que compreendem os respectivos motivos de reconhecimento para as referidas diferentes enzimas sortase.

[110] Desse modo, um conjugado de anticorpo fármaco pode ser criado o qual é composto de cada dois Ig de cadeia leve e Ig de cadeia pesada de comprimento total, contendo diferentes cargas úteis covalentemente fixadas às referidas cadeias pesada e leve.

[111] A referida modalidade resulta, preferivelmente, na conjugação específica de campo das pelo menos duas subunidades par a geração de conjugados de proteína de ligação-fármaco com especificidade de campo e igual conjugação de carga útil a cada uma das referidas subunidades.

[112] Em uma modalidade do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) a proteína de ligação se liga a HER-2. Preferivelmente, a proteína de ligação é um anticorpo específico para HER-2.

[113] Na referida modalidade, o anticorpo específico para HER-2 preferivelmente

[114] compreende as regiões CDR 1 – 6 de trastuzumab (hu4D5 humanizado)

[115] compreende o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de trastuzumab

[116] tem uma identidade de sequência de amino ácido de 90 % ou maior com as regiões ou domínios de a) ou b)

[117] é trastuzumab, ou um fragmento de ligação alvo ou derivado do mesmo, e/ou

[118] compete com trastuzumab para ligação a Her-2

[119] o anticorpo monoclonal anti-HER-2 trastuzumab se liga ao

domínio IV de HER-2. Preferivelmente, o anticorpo anti-HER-2 compreende as sequências de amino ácido primárias das cadeias IgH e IgL da figura 11 A (Seq ID Nos 1 e 2).

[120] As sequências de trastuzumab são também descritas em número de acesso ao banco de fármacos DB00072 (BIOD00098, BTD00098), que é incorporado por referência aqui, assim como no banco de dados de I MGT (VH: <http://www.immport.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637H> & VL: <http://www.immport.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637L>).

[121] Em outra modalidade do conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) a proteína de ligação se liga a CD30. Preferivelmente, a proteína de ligação é um anticorpo específico para CD30.

[122] Na presente modalidade, o anticorpo preferivelmente

[123] compreende as regiões CDR 1 – 6 de brentuximab (cAc10 quimérico)

[124] compreende o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de brentuximab

[125] tem uma identidade de sequência de amino ácido de 90 % ou maior com as regiões ou domínios de a) ou b)

[126] é brentuximab ou um fragmento de ligação alvo ou derivado do mesmo, e/ou

[127] compete com brentuximab para ligação a CD30

[128] as sequências de Brentuximab (clone cAc10), que é o componente de anticorpo do fármaco aprovado Adcetris/Brentuximab vedotin são descritas em US 2008213289A1.

[129] Preferivelmente, o anticorpo anti-CD30 compreende as sequências de amino ácido primárias das cadeias de IgH e IgL da figura 11 (Seq ID Nos 3 e 4).

[130] Preferivelmente, nas referidas modalidades, a toxina é uma de

fórmula (i),

[131] L1 é um ligante etilenodiamino,

[132] L2 é um ligante de peptídeo oligo-glicina (Glin) (com n sendo o comprimento preferido de 5 amino ácidos), e

[133] L3 representa os resíduos de amino ácido 1-4 de um motivo de pentapeptídeo de etiqueta de sortase processada (isto é, desprovido do resíduo G C-terminal (5° resíduo de amino ácido), que removido em sortase mediou a conjugação ao peptídeo (Gli)n ,

[134] Ligante X é ausente, e

[135] Y é um ligante de 5 amino ácidos entre o C-término da cadeia leve de Ig e L3, tendo preferivelmente a sequência de amino ácido GGGGS.

[136] Alternativamente, a toxina é uma de fórmula (ii), enquanto

[137] L1 é um ligante etilenamino,

[138] L2 é um ligante de peptídeo oligo-glicina (Glin), (com n sendo o comprimento preferido de 5 amino ácidos),

[139] L3 representa os resíduos de amino ácido 1-4 de um motivo de pentapeptídeo de etiqueta de sortase processada (isto é, desprovido do resíduo G C-terminal (5° resíduo de amino ácido), que removido com conjugação mediada a sortase ao peptídeo (Gli)n ,

[140] Ligante X é ausente, e

[141] Y é um ligante de 5 amino ácidos entre o C-término da cadeia leve de Ig e L3, tendo preferivelmente a sequência de amino ácido GGGGS.

[142] A presente invenção adicionalmente proporciona um método de produzir um conjugado de fármaco-proteína de ligação (BPDC) de acordo com a descrição acima, em que uma proteína de ligação que porta um motivo de reconhecimento de enzima sortase é conjugada, por meio da enzima sortase, a pelo menos um derivado de antraciclina conjugado que porta, como L2, um peptídeo de oligo-glicina (Glin).

[143] A tecnologia de sortase, as suas vantagens (conjugação

específica de campo, uma relação estequiometricamente definida entre a toxina e a proteína de ligação, alta eficiência de conjugação) é explicado em detalhes no pedido WO 2014140317A1, o conteúdo da qual se encontra aqui incorporado por referência. Explicações adicionais com relação as etiquetas de sortase são encontradas acima.

[144] É a modalidade preferida da presente invenção a conjugação de cargas úteis derivadas de PNU por tecnologia SMAC a um C-término de proteínas de ligação, e preferivelmente ao C-término de anticorpo ou cadeias de imunoglobulina a pelo menos um Ig de cadeia leve ou Ig de cadeia pesada. Isso é alcançado por gerar construtores de expressão de célula de mamífero para a proteína de ligação ou subunidades de imunoglobulina que codificam um motivo de reconhecimento de pentapeptídeo C-terminal para as enzimas sortase diretamente em seguida do C-término da proteína de ligação, ou a subunidade polipeptídeo de uma proteína de ligação multimérica, tal como por exemplo, um anticorpo.

[145] Deve ser entendido que o motivo de pentapeptídeo de sortase A de *Staphylococcus aureus*, que é LPXTG ou LPXSG e que foi mencionado anteriormente, é apenas proporcionado como um exemplo não limitante e pode ser substituído por qualquer outro motivo de pentapeptídeo reconhecido por enzimas sortase a partir de outras espécies ou outras classes, tal como sortase B a partir de *Staphylococcus aureus*, que reconhece o motivo de pentapeptídeo NPQTN. Também os motivos de reconhecimento podem ser usados que são reconhecidos por enzimas sortase modificadas por engenharia genética, tais como, por exemplo, LAETG, reconhecidos por uma versão de sortase modificada por engenharia genética A de *Staphylococcus aureus* recentemente descrito por Dorr et al. (2014).

[146] O pedido de patente internacional publicado sob o No. WO 2014140317 adicionalmente proporciona detalhes técnicos, descrição e capacitação com relação à conjugação da tecnologia de sortase, que é também chamado de tecnologia SMAC (tecnologia de conjugação de anticorpo mediada a sortase). A referida tecnologia permite a conjugação de duas entidades, uma marcada com a extensão (Gli)<sub>n</sub> (como

discutido para a toxina acima aqui) e uma com a assim chamada etiqueta de sortase, que é uma etiqueta de peptídeo que pode ser fixada, por exemplo, a uma proteína de ligação.

[147] As referidas etiquetas de sortase são oligopeptídeos, em geral motivos de pentapeptídeo, que são fundidos a uma primeira entidade (aqui: a proteína de ligação) que tem que ser conjugada à segunda entidade (aqui: o derivado de antraciclina), de tal modo que o C-término dos referidos oligopeptídeos de etiquetas de sortase permanecem livres. Como descrito em WO 2014140317 isso pode ser realizado por expressar as proteínas de ligação a partir dos vetores de expressão que codificam os amino ácidos adicionais para a etiqueta de pentapeptídeo sortase.

[148] A referida etiqueta de sortase é por exemplo, LPXTG ou LPXSG (para sortase A a partir de *Staphylococcus aureus*), LPXSG (para a sortase A 4S9 modificada por engenharia genética a partir de *Staphylococcus aureus* descrito em Dorr et al., 2014), ou LAXTG (para a sortase A 2A9 modificada por engenharia genética a partir de *Staphylococcus aureus* descrito em Dorr et al., 2014) com X sendo qualquer um dos 20 amino ácidos de ocorrência natural. Entretanto, as referidas etiquetas de sortase podem diferir em sequência para as enzimas sortase a partir de outras espécies bacterianas ou para as classes de sortase, como descrito em WO 2014140317, e na técnica anterior (Spirig et al. 2011).

[149] A segunda entidade compreende uma extensão de Glicina (Extensão Glin) com um N-término livre (-NH<sub>2</sub>), cuja extensão Glin é um peptídeo oligo-glicina. Preferivelmente, n é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 21$ . Em uma modalidade particularmente preferida, n é um número inteiro entre  $\geq 3$  e  $\leq 10$ , preferivelmente n = 3 ou n = 5. Ainda mais preferido, n = 5.

[150] A enzima sortase é então capaz de fundir as duas entidades uma a outra por meio de uma reação de transpeptidação, durante a qual o resíduo C-terminal de amino ácido (por exemplo, o G em LPXTG) é clivado, e então substituído pela primeira glicina da referida extensão de glicina.

[151] Em outra modalidade preferida o motivo de reconhecimento de

pentapeptídeo pode ser diretamente anexado ao último amino ácido C-terminal de ocorrência natural das cadeias leves ou cadeias pesadas de imunoglobulina, que em caso da cadeia leve kappa de imunoglobulina humana é o resíduo de cisteína C-terminal, que em caso de cadeia leve lambda de imunoglobulina humana é um resíduo de serina C-terminal e que no caso de cadeia pesada de IgG1 de imunoglobulina humana pode ser o resíduo de lisina C-terminal codificado por cDNA de Fcγ1 humano. Entretanto, outra modalidade preferida é também de se anexar diretamente o motivo de pentapeptídeo sortase ao segundo último resíduo de glicina C-terminal codificado por cDNA Fcγ1 humano, pelo fato de que, em geral, os resíduos de lisina terminal de cadeias pesadas de anticorpo são cortados por modificação pós-translacional em células de mamífero. Portanto, em mais do que 90% dos casos IgG1 humano de ocorrência natural é desprovido dos resíduos de lisina C-terminal da cadeia pesada de IgG1.

[152] Em outra modalidade preferida o motivo de reconhecimento de pentapeptídeo pode ser anexado ao C-término de uma cadeia pesada de IgG1 de uma imunoglobulina humana onde o resíduo de lisina C-terminal codificado por cDNA de Fcγ1 humano é substituído por um resíduo de amino ácido diferente de lisina.

[153] Foi descrito anteriormente que em alguns casos (por exemplo, no C-término das cadeias leves de Ig kappa, (Beerli et al. 2015) é benéfico se adicionar amino ácidos adicionais entre o C-término da proteína de ligação e a etiqueta de sortase, L3. Isso tem sido mostrado aprimorar a eficiência da conjugação da enzima de sortase de cargas úteis à proteína de ligação. No caso das cadeias leves de Ig kappa, foi observado que por adicionar 5 amino ácidos (GGGGS) entre o último amino ácido de cisteína C-terminal da cadeia leve de Ig kappa e a etiqueta de sortase aprimorou as cinéticas de conjugação, de modo que os C-términos das cadeias leves de Ig kappa e cadeias pesadas de Ig pode ser conjugado com cinéticas similares (vide: Beerli et al. (2015). Portanto, é outra modalidade preferida se opcionalmente incluir um ligante Y de entre  $\geq 1$  e  $\leq 21$  amino ácidos entre o último amino ácido C-terminal de uma proteína de ligação ou subunidade de anticorpo e a etiqueta de sortase, L3.

[154] A presente invenção adicionalmente proporciona o uso de um conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a descrição acima, ou produzido com um método da descrição acima, para o tratamento de um indivíduo humano ou animal

[155] que sofre a partir de,

[156] em risco de desenvolver, e/ou

[157] sendo diagnosticado para

[158] uma determinada condição patológica.

[159] A presente invenção adicionalmente proporciona o uso de um conjugado de proteína de ligação-fármaco de acordo com a descrição acima para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo humano ou animal

[160] que sofre a partir de,

[161] em risco de desenvolver, e/ou

[162] sendo diagnosticado para

[163] uma determinada condição patológica.

[164] Preferivelmente, a condição patológica é uma doença neoplástica. Mais preferivelmente, a doença neoplástica é

[165] um câncer que tem uma pontuação de expressão de HER-2 de 1+, 2+ ou 3+, como determinado por IHC ou ISH, cujo câncer é preferivelmente um câncer de mama

[166] um câncer que é CD30 positivo como determinado por IHC, ELISA ou citometria de fluxo, preferivelmente um linfoma, mais preferivelmente um linfoma de Hodgkin (HL) ou um linfoma de célula grande anaplástico sistêmico (sALCL)

[167] a determinação do status de HER-2 pode, por exemplo, ser determinado de acordo com as diretrizes de ASCO/CAP, que são descritas em Wolff et al 2013.

[168] A determinação do status de CD30 pode, por exemplo, ser determinado de acordo com o método de Young 2014.

[169] A presente invenção adicionalmente proporciona uma composição farmacêutica que compreende um conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a descrição acima, ou produzido com um método da descrição acima, e pelo menos um outro ingrediente farmacêuticamente aceitável.

[170] Descrição adicional

[171] De modo a superar as principais limitações da química tradicional de ligante de maleimida para a geração de BPDCs e ADCs, foi anteriormente desenvolvida uma abordagem enzimática para gerar BPDCs ou ADCs usando sequências de enzimas transpeptidase específicas de campo, seja empregando enzimas sortase, ou as assim chamadas inteínas divididas (vide: WO 2014140317A1). em particular, pode ser demonstrado que a conjugação específica de campo de cargas úteis de baixo peso molecular por enzimas sortase, no contexto de anticorpos, referidos aqui como tecnologia SMAC (tecnologia de conjugação anticorpo mediada a sortase), resulta em ADCs que são igualmente potentes como ADCs quimicamente conjugados em exterminar células de câncer in vitro, se a mesma proteína de ligação e a mesma carga útil é empregada, adicionalmente, a tecnologia SMAC gerou ADCs específicos para o alvo HER-2 levou a regressão de tumor similarmente potente em modelos de xenotransplante, se o mesmo anticorpo alvo (anti-HER-2 trastuzumab) e a mesma carga útil tóxica (DM1) foi empregada (WO 2014140317A1). Entretanto, primeiro, em ADCs gerados por SMAC nenhuma química de ligante de maleimida foi empregada, e segundo, a reação de conjugação foi realizada em um modo específico de campo aos C-términos de qualquer uma das cadeias de anticorpo IgH ou IgL, de modo que ADCs mais homogêneos foram obtidos.

[172] No caso de tecnologia SMAC, a conjugação específica de campo pode ser efetuada, por exemplo, por enzima sortase A recombinante de *Staphylococcus aureus*, que especificamente reconhece um motivo de pentapeptídeo LPXTG ou LPXSG (X = qualquer um dos 20 amino ácidos de ocorrência natural) e que pode ser anexado a um anticorpo recombinante pretendido para a conjugação. Sortase A então usa uma extensão de oligo-glicina como um nucleófilo para catalisar a

transpeptidação, pela qual o grupo amino da oligo-glicina efetua o ataque nucleofílico para a ligação de peptídeo entre a treonina ou serina e glicina do motivo de pentapeptídeo LPXTG ou LPXSG. Isso resulta na ruptura daquela ligação de peptídeo e na formação de uma nova ligação de peptídeo entre a glicina N-terminal do peptídeo de oligo-glicina (vide Figura 1), isto é, resultando em uma transpeptidação.

[173] Embora tenha sido mostrado que os conjugados trastuzumab-DM1 gerados por conjugação mediada a sortase têm uma potência comparável aos conjugados DM1 quimicamente conjugados (T-DM1, ou Kadcyła®, já aplicado na clínica), uma maior potência de ADCs gerados por tecnologia SMAC não foi alcançada (WO 2014140317A1). Isso não foi esperado, pelo fato de que o mesmo anticorpo alvo e a mesma carga útil foram empregados.

[174] Com base no referido e também em outros experimentos com diferentes anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a outros TSAs, que são potencialmente expressos em níveis mais baixos em células de câncer do que o alvo HER-2, ou que são potencialmente menos eficientemente internalizados em ligação a ADC (dados não mostrados), se tornou aparente que a carga útil tóxica com maior potência do que maytansinas, e/ou com um modo de ação potencialmente diferente é necessária para produzir ADCs suficientemente efetivas. Adicionalmente, a carga útil tem que ser possível de modificação a pelo menos um grupo reativo, permitindo a adição de um peptídeo de oligo-glicina para permitir a conjugação da sortase da carga útil a proteínas de ligação modificadas a LPXTG- ou LPXSG. Por último, se toxinas de maior potência são empregadas, a modificação deve resultar em uma ligação estável entre a extensão de glicina e a carga útil, de modo a evitar a liberação indesejada da carga útil tóxica na circulação, mas ao mesmo tempo a toxina deve ainda resultar em um efetivo extermínio de células de câncer com a ligação específica e internalização de BPDC ou ADC nas células de tumor.

[175] A avaliação empírica de diferentes cargas úteis tóxicas descrita na técnica anterior no contexto de tecnologia SMAC resultou no achado de que um

derivado de antraciclina de nemorubicina altamente potente, chamado PNU-159682 (Quintieri et al., 2005) (vide também a figura 2), que foi modificado com um espaçador de etilenodiamina, de modo a permitir a adição de uma extensão de pentaglicina pode muito eficientemente ser conjugado em anticorpos modificados por LPXTG por tecnologia SMAC produzindo ADCs quase completamente conjugados com base em análises dos produtos por HIC (cromatografia de interação hidrófoba) e cromatografia de fase reversa (dados não mostrados). Adicionalmente, se esse derivado PNU-159682 modificado, denominado PNU-EDA-Gli5, é SMAC conjugado a vários anticorpos monoclonais, como descrito nos EXEMPLOS, proporcionados abaixo, um extermínio de células de tumor altamente potente e TSA-dependente foi efetuado. Em particular, células de câncer de mama humano que expressam baixo HER-2 podem ser eficientemente exterminadas in vitro com tecnologia SMAC conjugado PNU-EDA-Gli5, conjugados, enquanto que os conjugados de maytansina-toxina dificilmente foram efetivos. Isso demonstra a utilidade potencial do derivado PNU-EDA-Gli5 para gerar potentes BPDCs e ADCs, preferivelmente contendo PNU-EDA-Gli5, ou qualquer PNU-derivado com um peptídeo de oligo-glicina com pelo menos duas glicinas fixadas ao mesmo. Adicionalmente, demonstra a utilidade de BPDCs e ADCs contendo preferivelmente PNU-EDA-Gli5, ou qualquer PNU-derivado com um peptídeo de oligo-glicina como a carga útil para o tratamento de doenças como câncer.

[176] Embora derivado de antraciclina PNU-159682 (Figura 2) e o seu uso no contexto de conjugação química e ADCs tenham sido descritos na técnica anterior (por exemplo, WO 2009099741A1, WO 2010009124, WO 2012073217, proporcionado por referência aqui), um composto similar ao PNU-EDA-Glin, ou ADCs contendo conjugado de sortase PNU-EDA-Glin, como descrito aqui, ainda não foram descritos na técnica anterior, nem tão pouco a particular estrutura de PNU-derivado com espaçador EDA e ligante Glin descrito ou reivindicado em qualquer um dos documentos da técnica anterior. Adutos estáveis, nos quais os derivados PNU são ligado estavelmente a proteínas por meio da ligação de peptídeos em vez do que por ligações éster e ligantes de maleimida podem provar ser superior, em termos de estabilidade e comportamento

farmacocinético in vivo, em virtude de uma estabilidade de ligação de peptídeos no soro em geral alta, como descrito nos Exemplos adicionalmente abaixo. Ademais, os derivados de PNU com Extensão Glin que são esperados exibir conjugados de fármaco estáveis após a conjugação com tecnologia SMAC são descritos na figura 6A e na figura 6B.

#### Experimentos e Figuras

[177] Embora a presente invenção tenha sido ilustrada e descrita em detalhes nos desenhos e descrição anterior, a referida ilustração e descrição devem ser consideradas apenas ilustrativa ou exemplificativa e não restritiva; a presente invenção não é limitada às modalidades descritas. Outras variações para as modalidades descritas podem ser entendidas e efetuadas por aqueles versados na técnica com a prática da invenção reivindicada, a partir de um estudo dos desenhos, da descrição, e das reivindicações em anexo. Nas reivindicações, o termo “que compreende” não exclui outros elementos ou etapas, e o artigo indefinido “a” ou “um” não exclui a pluralidade. O mero fato de que determinadas medidas são recitadas em reivindicações dependentes mutuamente diferentes não indica que uma combinação das referidas medidas não pode ser usada com vantagem. Quaisquer sinais de referência nas reivindicações não devem ser construídos como limitante do âmbito.

[178] Todas as sequências de amino ácidos descritas aqui são mostradas a partir de N-término a C-término; todas as sequências de ácido nucleico descritas aqui são mostradas 5'->3'.

[179] Exemplo 1: Geração de anticorpos monoclonais conjugados de PNU-EDA-Glin-carga útil C-terminal específico de campo brentuximab e trastuzumab por tecnologia de conjugação de anticorpo mediado a sortase (SMAC-tecnologia)

[180] As sequências de região variável de cadeias pesada e leve de anticorpo monoclonal brentuximab (clone cAc10) específico para a CD30 humana alvo foram obtidas a partir da patente US 2008213289A1, os do anticorpo trastuzumab específico para HER-2 humano contido no anticorpo comercial Herceptina (trastuzumab), ou o derivado ADC Kadcyła® do mesmo, foram derivados a partir do banco de dados

online I MGT (VH: <http://www.immport.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637H> & VL: <http://www.immport.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637L>. Chimeric mAb cAc10 e trastuzumab mAb humanizado foram produzidos com as suas cadeias pesada e leve etiquetas em C-término com a sequência de reconhecimento de sortase A e uma etiqueta de purificação adicional de afinidade a Strep II (sequência de etiqueta HC: LPETGGWSHPQFEK; sequência de etiqueta LC: GGGGSLPETGGWSHPQFEK) usando os métodos conhecidos daqueles versados na técnica. (vide as figuras 11A & 11B).

[181] O derivado de antraciclina PNU-EDA-Gli5 (figura 3A) foi proporcionado por Levana Biopharma, San Diego, CA, que sintetizou um peptídeo de pentaglicina ao grupo carbonila de PNU159682 via um ligante etilenodiamino (EDA) de acordo com o esquema de síntese da Figura 3B. Para isso, PNU159682 oferecido no comércio foi primeiro oxidado para se obter um ácido carboxílico do mesmo (1 na figura 3B) com NaIO<sub>4</sub> em 60% metanol em temperatura ambiente por 3 horas. Posteriormente, N-hidroxisuccidimida (NHS, 46 mg, 400 µmol) e etil(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 100 mg, 523 µmol) em diclorometano (DCM) foram adicionados a uma solução de 1 (51 mg, 81 µmol) em 6 mL de DCM. Após 30 min, a mistura foi lavada com água (2 x 6 mL), seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporada. O resíduo foi então dissolvido em 2 mL de dimetilformamida (DMF) antes da adição da amina (2 na Figura 3B, 55 mg, 81 µmol, como sal de trifluoroacetato), seguido pela adição de N,N-diisopropiletilamina (DIEA, 50 µL). A mistura foi agitada por 1 hora antes da adição de piperidina (40 µL), seguido por 20 minutos de agitação adicional. A mistura foi purificada por HPLC para se obter PNU-EDA-Gli5 (3 na Figura 3B, 34 mg, 44%) como um sólido vermelho; MS m/z 955.2 (M+H).

[182] PNU-EDA-Gli5 foi conjugado em mAbs por incubar mAbs etiquetados com LPETG [10 µM] com PNU-EDA-Gli5, [200 µM] na presença de 0,62 µM de Sortase A em 50 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5 por 3,5 horas a 25°C. A reação foi parada por passar a mesma através de uma coluna HiTrap de

Proteína A (GE Healthcare) equilibrada com 25 mM de fosfato de sódio pH 7.5, seguido por lavagem com 5 volumes de coluna (CVs) de tampão. Conjugado ligado foi eluído com 5 CVs de tampão de eluição (0.1 M ácido succínico, pH 2.8) com frações de 1 CV coletadas em tubos contendo 25% v/v de Base 1M Tris para neutralizar o ácido. As frações contendo proteína foram agrupadas e formuladas em 10 mM de Succinato de sódio pH 5.0, 100 mg/mL de Trehalose, 0,1% w/v de Polisorbato ou fosfato 20 por cromatografia de coluna G25 usando as colunas NAP 25 (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

[183] O teor do agregado de cada conjugado foi avaliado por cromatografia em uma coluna de TOSOH TSKgel G3000SWXL 7,8 mm x 30 cm, rodada de coluna de 5 µm a 0,5 mL/min em 10% de IPA, 0,2 M de Fosfato de potássio, 0,25 M de cloreto de Potássio, pH 6,95. A carga do fármaco foi avaliada não só por Cromatografia de interação hidrófoba (HIC) mas também por Cromatografia de fase reversa. HIC foi realizada em uma coluna TOSOH Butyl-NPR 4,6 mm x 3,5 cm, 2,5 µm rodada a 0,8 mL/min com um gradiente linear de 12 minutos entre A - 1.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 mM NaPi, pH = 6.95 ± 0,05 e B - 75% de 25mM NaPi, pH = 6.95 ± 0,05, 25% de IPA. Cromatografia de fase reversa foi realizada em uma coluna Polymer Labs PLRP de 2,1 mm x 5 cm, 5 µm rodando a 1 mL/min/80°C com um gradiente linear de 25 minutos entre 0,05% de TFA/H<sub>2</sub>O e 0,04% de TFA/CH<sub>3</sub>CN. As amostras foram primeiro reduzidas por incubação com DTT a pH 8.0 a 37°C por 15 minutos. Ambos os ADCs com base em PNU-EDA-Gli5 foram predominantemente monoméricos e apresentavam proporções de fármaco para anticorpo próximas à máxima teórica de, respectivamente, 4. A Tabela 2 resume os resultados da fabricação do ADC.

mAb	Alvo	Etiqueta HC	Etiqueta LC	% mono	DAR
Brentuximab	CD30	Sim	Sim	99,6	4,0
Trastuzumab	HER-2	Sim	Sim	98,2	3,9

Tabela 2. Sumário de ADCs com base em PNU-EDA-Gli5-fabricado. HC, cadeia pesada; LC, cadeia leve; % de mono, % de teor de monômero; DAR, proporção de fármaco-para-

anticorpo.

[184] Exemplo 2. Teste de toxicidade in vitro com conjugado de Sortase A- Brentuximab- PNU-EDA-Gli5 e Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5 ADCs

[185] A citotoxicidade de Brentuximab-PNU-EDA-Gli5 foi investigada usando Karpas-299, uma linhagem de célula de linfoma não Hodgkin's que expressa altos níveis de CD30, e L428, a linhagem de célula de linfoma não Hodgkin's que expressa níveis de baixo a moderado de CD30 (Figura 4). Como controles, a eficácia de cAc10-PNU-EDA-Gli5 foi comparada àquela do conjugado cAc10-vcPAB-MMAE específico a CD30 Adcetris® oferecido no comércio (como o controle positivo) e o conjugado Trastuzumab-DM1 específico para HER-2 conjugado Kadcylla® oferecido no comércio (como o controle negativo). Para isso, as células foram laminadas em placas de 96 cavidades em 100 µl de RPMI/10% de FCS a uma densidade de 10<sup>4</sup> células por cavidade e desenvolvidas a 37°C em uma incubadora umidificada a 5% e atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após um dia de incubação, meio de 25 µL foi cuidadosamente removido a partir de cada cavidade e substituído por 25 µL de diluições seriais de 3,5 vezes de cada ADC em meio de desenvolvimento, o que resulta em concentrações finais de ADC que varia a partir de 20 µg/mL a 0,25 ng/mL. Cada diluição foi realizada em duplicata. Após 4 dias adicionais, as placas foram removidas da incubadora e equilibrada para temperatura ambiente. Após aproximadamente 30 minutos, 100 µL de solução CellTiter-Glo® Luminescent (Promega, Cat.No G7570) foram adicionados a cada cavidade e após a agitação das placas a 450 rpm por 5 min seguido por uma incubação em 10 minutos sem agitação, luminescência foi medido em uma Tecan Infinity F200 com um tempo de integração de 1 segundo por cavidade.

[186] Como esperado, o ADC anti-CD30 Adcetris® usado como um controle positivo potencialmente exterminou as células CD30HI Karpas-299 com uma EC<sub>50</sub> de 8,2 ng/mL (Figura 4A), enquanto foi ineficiente no extermínio das células CD30LO L428 (Figura 4B). De modo diferente, o ADC anti-HER-2 Kadcylla® usado como um controle negativo não exibiu extermínio específico de célula e foi ineficaz em qualquer uma

das linhagens celulares (Figura 4). Significativamente, ADC cAc10-PNU-EDA-Gli5 sortase conjugado potencialmente exterminou as células CD30HI Karpas-299 com um valor de EC50 de 6,9 ng/mL (Figura 4A). cAc10-PNU-EDA-Gli5 exterminou as células CD30LO L428 apenas em uma maior concentração, similar aos ADCs de controle empregados, o que indica que a eficácia do referido ADC é de fato específica e mediada por ligação de CD30 (Figura 4B). Assim, a conjugação mediada a sortase de PNU-EDA-Gli5 produziu um ADC com uma potência muito alta, mesmo excedendo aquela do ADC de referência Adcetris®.

[187] A potência para o extermínio de célula de tumor de um ADC Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5 gerado por SMAC foi investigada usando células SKBR3, uma linhagem celular de câncer de mama humana que super expressa HER-2 e células T47D, uma linhagem celular de câncer de mama que expressa naturalmente baixos níveis de HER-2, e isso foi comparado ao conjugado ADC Trastuzumab-DM1 HER-2-específico Kadcyra® (Figura 5). Para isso, as células foram laminadas em placas de 96 cavidades em 100 µL de DMEM/10% de FCS a uma densidade de 104 células por cavidade e testes foram realizados exatamente como descrito acima.

[188] Como esperado, o ADC de controle positivo Kadcyra® potencialmente exterminou células de câncer de mama SKBR3 humana que super expressam HER-2, com uma EC50 de 23,7 ng/mL (Figura 5A), ao mesmo tempo sendo ineficaz ao extermínio das células HER-2LO T47D (Figura 5B). Significativamente, Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5 gerados por tecnologia SMAC exibiu superior citotoxicidade e não só exterminou células SKBR3 que super expressão HER-2, mas também células HER2LO T47D, com valores de EC50, respectivamente, de 4,8 e 11,0 ng/mL (Figura 5). Assim, a conjugação mediada a sortase de PNU-EDA-Gli5 em Trastuzumab rende um ADC com uma potência muito alta, excedendo aquela do ADC comercialmente oferecido e aprovado pela FDA Kadcyra®, e é mesmo efetivo em células de HER2LO de câncer de mama humano.

[189] Exemplo 3: estabilidade in vitro do soro de ADC cAc10-PNU-

EDA-Gli5 conjugado a Sortase A em comparação ao ligante maleimida contendo trastuzumab emtansine (Kadcyla®)

[190] A estabilidade in vitro do soro de brentuximab-PNU-EDA-Gli5 (cAc10-PNU-EDA-Gli5) e Kadcyla ADCs foi avaliada em um teste de estabilidade do soro com base em ELISA. Em suma, cAc10-PNU-EDA-Gli5 foi diluído em soro de camundongo (Sigma, M5905), rato (Sigma, R9759) e soro humano (Sigma, H6914), e incubado a 37°C. Amostras foram congeladas em nitrogênio líquido nos dias 0, 3, 7, 14 e armazenado a -80°C até a análise por ELISA. Para os soros de roedores, a diluição em série de amostras de soro de cAc10-PNU-EDA-Gli5 foram capturados em placas de ELISA revestidas com 2µg/mL de um mAb anti-PNU de rato (produzido internamente por imunização de ratos com um conjugado de IgG-PNU humano e leitura com um conjugado BSA-PNU) para ligar ADC, ou com Fc F(ab')<sub>2</sub> anti-humano (Jackson ImmunoResearch) para ligar IgG Total, e detectado com uma diluição 1:2500 de um IgG F(ab')<sub>2</sub> anti-humano HRP-conjugado (Jackson ImmunoResearch). Para o soro de primatas, 2 µg/mL de CD30 humano recombinante (Sino Biologicals, 10777-H08H) foi revestido em placas de ELISA e uma diluição de 1:2500 de IgG F(ab')<sub>2</sub> anti-humano HRP-conjugado (Jackson ImmunoResearch) ou 1 µg/mL de um IgG anti-PNU de rato (produzido internamente) seguido por Fc F(ab')<sub>2</sub> anti-rato HRP-conjugado (Jackson ImmunoResearch) foi usado para a detecção de IgG total e ADC, respectivamente. No caso de Kadcyla, o mesmo protocolo foi usado como acima para determinar a estabilidade em camundongo, rato e soro humano mas com um mAb anti-maytansina internamente produzido para ligar ADC. As concentrações do soro de ADC e IgGs totais foram calculadas a partir de meios valores máximos das titulações da amostra por comparação com a amostra do mesmo ADC de concentração conhecida.

[191] As figuras 7 A mostram a excelente estabilidade de cAc10-PNU-EDA-Gli5 ADC, particularmente em comparação àquela do ligante de maleimida contendo Kadcyla (Figura 7 B), virtualmente sem nenhuma redução nos níveis de ADC através de todo o experimento em qualquer soro das quatro espécies testadas. Por

adaptar os pontos no tempo entre o dia 0 e 14 a uma função de degradação exponencial de uma fase restrita para alcançar a concentração final de 0, os valores de meia vida de cAc10-PNU-EDA-Gli5 e Kadcyta foram determinados em cada soro. A meia vida de Kadcyta foi de 3,7 dias, 4,4 dias e 2,9 dias em soro de camundongo, de rato e soro humano, respectivamente, enquanto que a meia vida de cAc10-PNU-EDA-Gli5 foi maior do que 14 dias em soro de camundongo, de rato e soro humano.

[192] Exemplo 4: estabilidade in vivo de Ac10-Gli5-PNU Sortase A-conjugado em ratos

[193] ADC Ac10-Gli5-PNU foi resfriado a temperatura ambiente e diluído a 0,2 mg/mL em PBS estéril para uma concentração de dosagem de 1 mg/kg. As amostras foram injetadas i.V. a um volume de 5 mL/kg em nove ratos fêmeas Swiss Webster. O sangue foi coletado a partir dos animais após 1h, 24h, 72h, 7 dias, 14 dias, e 21 dias. Os animais individuais de acordo com os padrões éticos foram apenas usados para duas coletas de sangue em dois pontos do tempo com pelo menos uma semana de distância entre as coletas. Assim, três camundongos tiveram o sangue coletado após 1h e 7 dias, três diferentes camundongos tiveram o sangue coletado após 24h e 14 dias, e três diferentes camundongos adicionais tiveram o sangue coletado após 72h e 21 dias perfazendo um total de nove camundongos por grupo. Para cada grupo de animais, aproximadamente 200 µL de sangue foi coletado por lanceta de punção da veia submandibular durante a primeira coleta, e aproximadamente 600 µL de sangue por lanceta de punção da veia submandibular durante a coleta final (sangria terminal). Todo o sangue foi coletado em tubos contendo K2-EDTA. O plasma foi isolado a partir de sangue por centrifugação a 1500 g por 10 minutos, e transferido para criofrascos estéreis para armazenamento a -80°C até a análise por ELISA como descrito no Exemplo 4.

[194] Os dados na Figura 8 mostram a elevada estabilidade do ADC gerado por tecnologia SMAC. Por toda a duração do experimento, as concentrações de ADC são apenas marginalmente mais baixas do que as medidas para IgG total, o que implica em que o ligante entre fármaco e anticorpo é estável in vivo. Ao se adaptar os

pontos de tempo entre o dia 3 e 21 a uma função de degradação exponencial de uma fase restrita para alcançar a concentração final de 0, a meia vida in vivo na fase lenta foi determinada com 8.3 e 7.8 dias para o IgG total e ADC, respectivamente.

[195] Exemplo 5: Descrição e caracterização de HER-2 que expressam clones de EMT6

[196] A citotoxicidade de ADCs anti-HER-2 foi investigada usando a linhagem celular de tumor mamário de murino EMT-6 modificada por engenharia genética de modo a super expressar HER-2 humano. As células EMT-6 foram cultivadas como monocamadas em DMEM (Meio Eagle modificado a Dulbecco – elevada glicose) suplementado com 10% (v/v) de FCS (Soro Fetal de Bezerro), 1% (v/v) de 10,000 IU/mL penicilina-estreptomicina e 1% (v/v) de 200 mM L-glutamina.

[197] As células EMT-6 foram eletroporadas com um vetor de expressão que codifica o gene HER-2 humano e um marcador de resistência a puomicina e os grupos de células que expressaram estavelmente HER-2 humano foram selecionados usando os métodos conhecidos daqueles versados na técnica.

[198] A expressão de HER-2 foi confirmada por citometria de fluxo. Em suma, em seguida da tripzinização, 106 células foram centrifugadas em tubos FACS; os grânulos obtidos foram ressuspensos em PBS (salina tamponada a fosfato) suplementados com 2% de FCS. As células foram então incubadas com o anticorpo anti-HER-2 trastuzumab (30 min, 4°C), seguido por centrifugação e lavagem (3 mL de PBS com 2% de FCS). As células foram então ressuspensas como anteriormente e incubadas com anticorpo IgG anti-humano (Fc gama-específico) PE (Ebioscience) no escuro (30 min, 4°C), antes da lavagem (4 mL de PBS com 2% de FCS). Citometria de fluxo foi então realizada em FACS Calibur (BD).

[199] As células EMT-6 transfectadas com HER-2 foram armazenadas uma a uma por citometria de fluxo usando a FACS ARIA II para isolar clones de célula individual. As referidas foram expandidas e a expressão de HER-2 foi verificada por citometria de fluxo.

[200] A Figure 9 mostra os dados de análise FACS do clone selecionado para estudos in vivo (Exemplo 6).

[201] Exemplo 6: eficácia in vivo do ADC Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5 conjugado a Sortase A em um modelo ortótico de câncer de mama

[202] A eficácia in vivo de Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5 foi avaliada em um modelo de camundongo ortótico imunocompetente de câncer de mama positivo para HER-2. Para isso, 106 células de câncer de mama de camundongo EMT6 que expressam HER-2 humano (Exemplo 6), anteriormente determinado ser adequado para o desenvolvimento in vivo, foram implantadas no tecido adiposo da mama direita de fêmeas de camundongos Balb/c. Adicionalmente, animais de controle foram implantados com células EMT-6 negativas para HER-2. No a seguir, volumes de tumor principal foram medidos por calibragem. Após 13 dias, quando um volume de tumor médio de 100-150mm<sup>3</sup> foi alcançado, os animais que apresentavam tumor foram aleatorizados em grupos de 6 animais cada de acordo com os tamanhos do tumor. Os animais foram tratados no mesmo dia (dia 13, isto é, o dia da aleatorização) e 7 dias mais tarde (dia 20) por injeção intravenosa do ADC de referência Kadcyła® (15 mg/kg), Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5 (1 mg/kg) ou veículo de controle. Os tamanhos do tumor foram monitorados por calibragem e os animais cujo volume de tumor alcançou 1000-1500 mm<sup>3</sup> foram terminados (Figura 10).

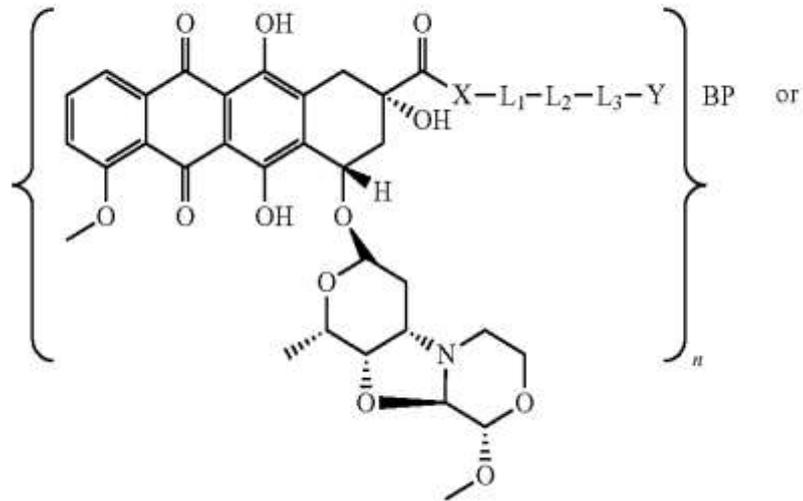
[203] Os tumores em camundongos com veículo de controle se desenvolveram rapidamente e alcançaram um tamanho médio de aproximadamente 1000 mm<sup>3</sup> dentro de 30 dias após o transplante das células (Figura 10A). O tratamento com Kadcyła® teve pouco efeito no desenvolvimento do tumor na maioria dos animais. Apenas um de seis animais exibiu um significativo retardo no desenvolvimento do tumor (Figura 10C). Em um contraste impressionante, em todos os animais tratados com Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5, os tumores continuamente regrediram durante o tratamento e foram essencialmente não detectados no dia 30 após o transplante das células (Figura 10D). Nenhum tumor foi detectável na maioria dos animais até o dia 60, e a recorrência de tumor

foi observada apenas em um animal em torno do dia 40. Significativamente, a atividade anti-tumor de Trastuzumab-PNU-EDA-Gli5 foi altamente específica e o tratamento de camundongos que portavam tumores negativos para HER-2 não levou à regressão do tumor (Figura 10B). Juntos de um modo geral, os dados demonstraram que o conjugado específico de campo mediado a sortase dos ADCs Trastuzumab-EDA-Gli5-PNU produziram um ADC com atividade de extermínio de célula de tumor in vivo muito superior ao do ADC da marca de referência Kadcyła®.

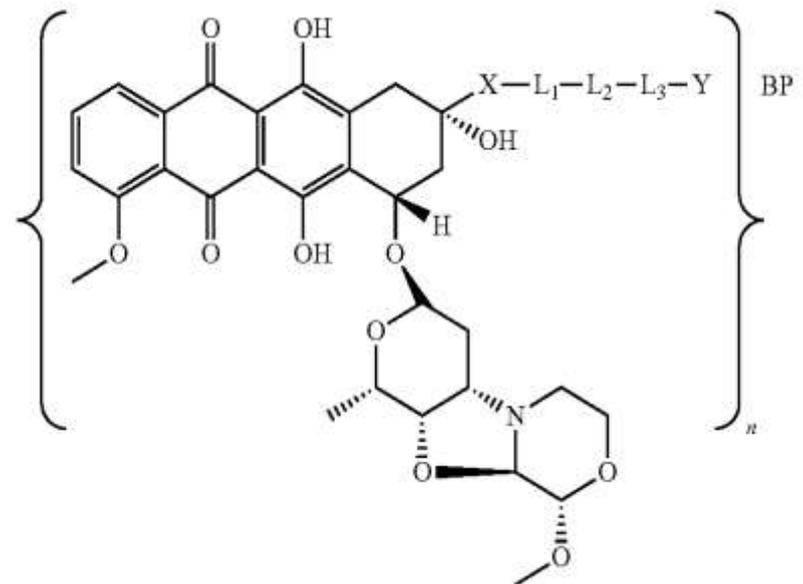
**REIVINDICAÇÕES**

1. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) compreendendo um derivado de antraciclina (PNU), caracterizado pelo fato que o conjugado droga-proteína de ligação (BPDC) tem a fórmula (iii) ou a fórmula (iv) a seguir

fórmula (iii)



fórmula (iv)



em que:

cada um de L1 - L3 representa um ligante obrigatório,

L1 representa um ligante alquilen-amino ou um

ligante alquilenodiamino;

L2 representa um peptídeo de oligo-glicina (Glin);

L3 representa um motivo de peptídeo que resulta a partir de clivagem específica de um motivo de reconhecimento de enzima sortase;

X não está presente e Y representa ligantes opcionais em que Y, quando presente, varia entre  $>1$  e  $< 21$  amino ácidos,

BP é um anticorpo, e

n é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 10$ .

2. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o peptídeo de oligo-glicina (Glin) é conjugado ao derivado de antraciclina por meio de um ligante etilenodiamino (EDA), designado como L1, cujo ligante etilenodiamino é conjugado ao derivado de antraciclina por meio de uma primeira ligação amida, enquanto o mesmo é conjugado ao carbóxi término do peptídeo de oligo-glicina por meio de uma segunda ligação amida, ou por meio de um ligante etilenoamino (EA), designado como L1, cujo ligante etilenoamino é diretamente conjugado ao derivado de antraciclina enquanto o mesmo é conjugado ao carbóxi término do peptídeo de oligo-glicina por meio de uma ligação amida.

3. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o referido motivo de reconhecimento de enzima sortase compreende um pentapeptídeo.

4. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o referido motivo de reconhecimento de enzima sortase compreende pelo menos uma sequência de amino ácido selecionada a partir do grupo consistindo em (N-terminal a C-terminal) LPXTG (SEQ ID NO:05); LPXSG, (SEQ ID NO:06); e LAXTG (SEQ ID NO:07), em que X em cada uma das sequências SEQ ID NOs:5-7

representa qualquer ácido amino.

5. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o derivado de antraciclina (PNU) é conjugado, por meio dos três ligantes obrigatórios, ao carbóxi término da proteína de ligação, ou ao carbóxi término de pelo menos um domínio ou subunidade do mesmo.

6. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o BP é um anticorpo que se liga a pelo menos uma entidade selecionada a partir do grupo que consiste de um receptor, um antígeno, um fator de crescimento, uma citocina, e um hormônio.

7. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o BP é um anticorpo que compreende pelo menos duas subunidades.

8. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato que pelo menos uma subunidade compreende o derivado de antraciclina.

9. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato que o BP é um anticorpo que se liga a HER-2.

10. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato que o anticorpo compreende as regiões CDR 1-6 de trastuzumab.

11. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato que o anticorpo compreende o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de trastuzumab.

12. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato que o anticorpo tem uma identidade de sequência de amino

ácido de 90 % ou maior com o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de trastuzumab.

13. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato que o anticorpo compete com trastuzumab para ligação a HER-2

14. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que a proteína de ligação é um anticorpo que se liga a CD30.

15. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato que o anticorpo compreende as regiões CDR 1-6 de brentuximab.

16. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato que o anticorpo compreende o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de brentuximab.

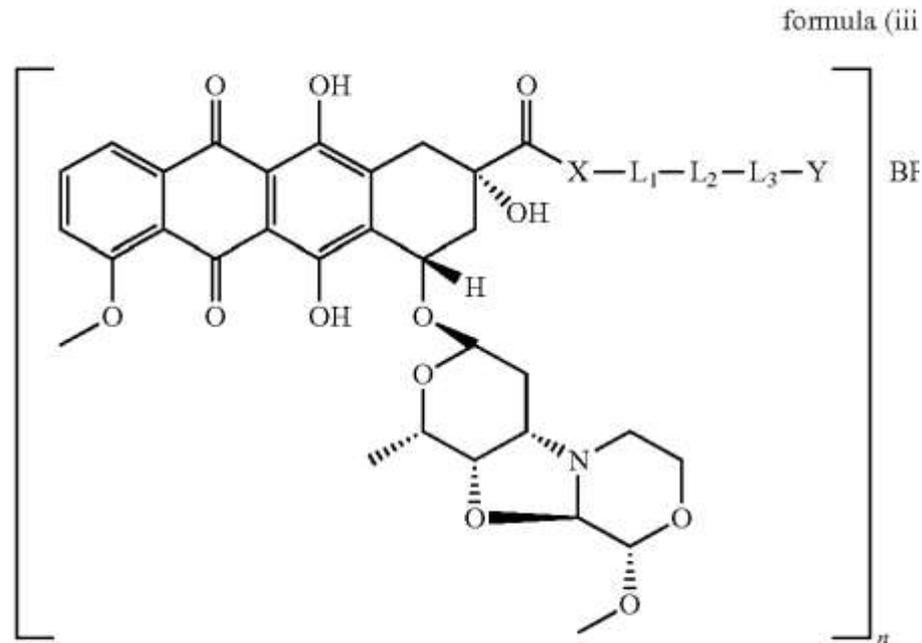
17. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato que o anticorpo tem uma identidade de sequência de amino ácido de 90 % ou maior com o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de brentuximab.

18. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato que o anticorpo compete com brentuximab para ligação a CD30.

19. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato que compreende um conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 1 e pelo menos um outro ingrediente farmacêuticamente aceitável.

20. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) caracterizado pelo fato que compreende um derivado de antraciclina (PNU), caracterizado pelo fato que o conjugado

droga-proteína de ligação (BPDC) tem a fórmula (iii) a seguir



em que:

X está ausente;

L1 representa etilenodiamino (EDA);

L2 representa um peptídeo de oligo-glicina (Glin) no qual p é um número inteiro  $\geq 1$  e  $\leq 21$ ;

L3 consiste em resíduos de ácido amino de um motivo de reconhecimento de enzima sortase processado (N-terminal a C-terminal) Leu-Pro-Xaa-Thr-Gly (LPXTG) (SEQ ID NO:05) em que Xaa é qualquer ácido amino);

Y, quando presente, é (N-terminal a C-terminal) Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G4S) (SEQ ID NO: 8);

BP é um anticorpo IgC; e

n é um número inteiro entre  $\geq 1$  e  $\leq 10$ .

21. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato que o N-terminal Gly de Y é conjugado ao último C-terminal Cys ácido amino de pelo menos uma cadeia leve do anticorpo.

22. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato que o anticorpo compreende o domínio variável de cadeia

pesada e o domínio variável de cadeia leve de trastuzumab.

23. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato que o anticorpo tem uma identidade de sequência de amino ácido de 90 % ou maior com o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve de trastuzumab.

24. Conjugado de proteína de ligação-fármaco (BPDC) de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato que o anticorpo compete com trastuzumab para ligação a HER-2.

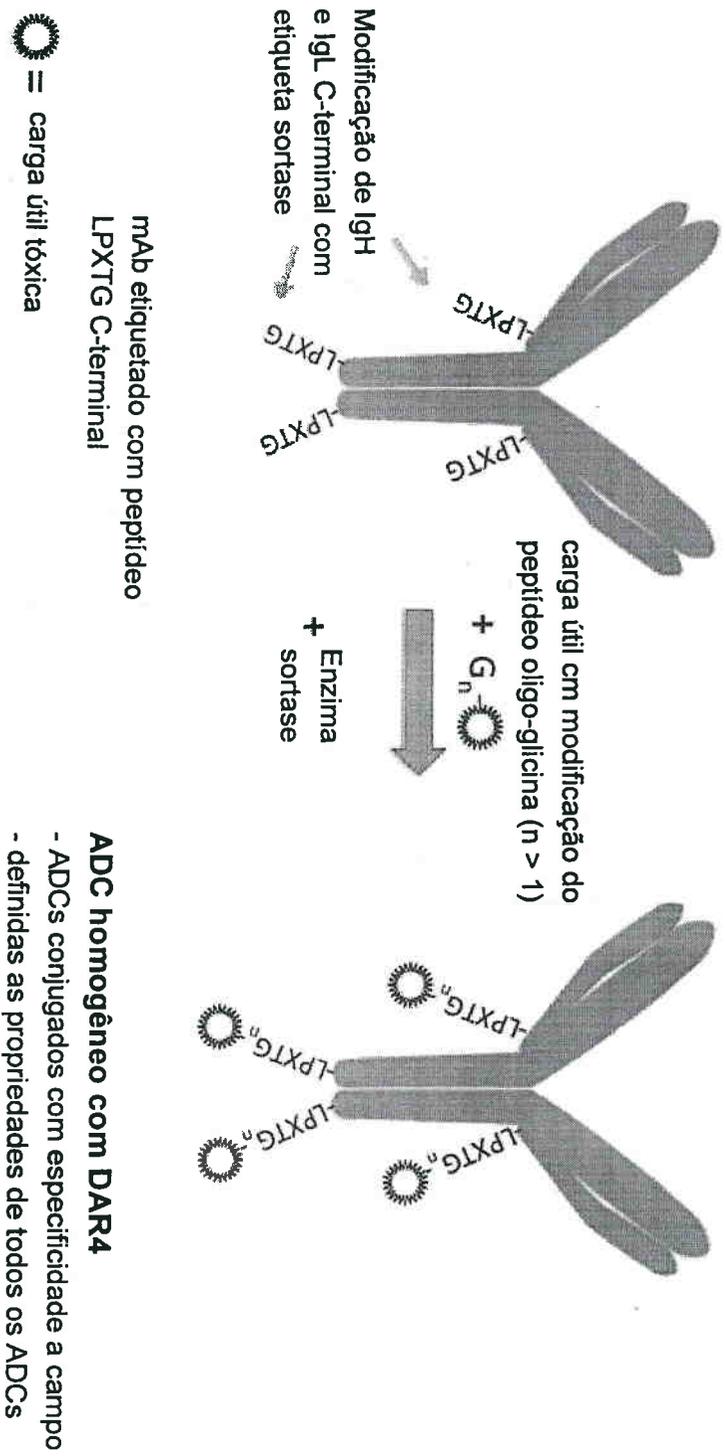
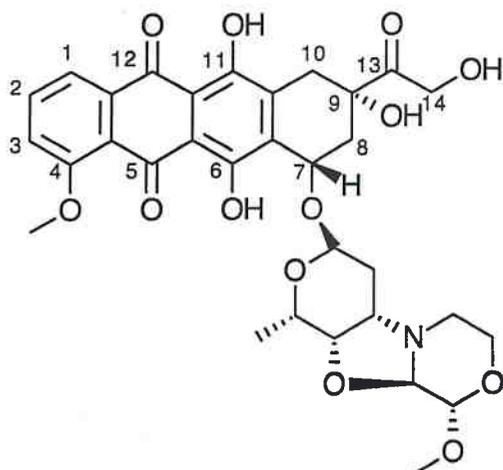
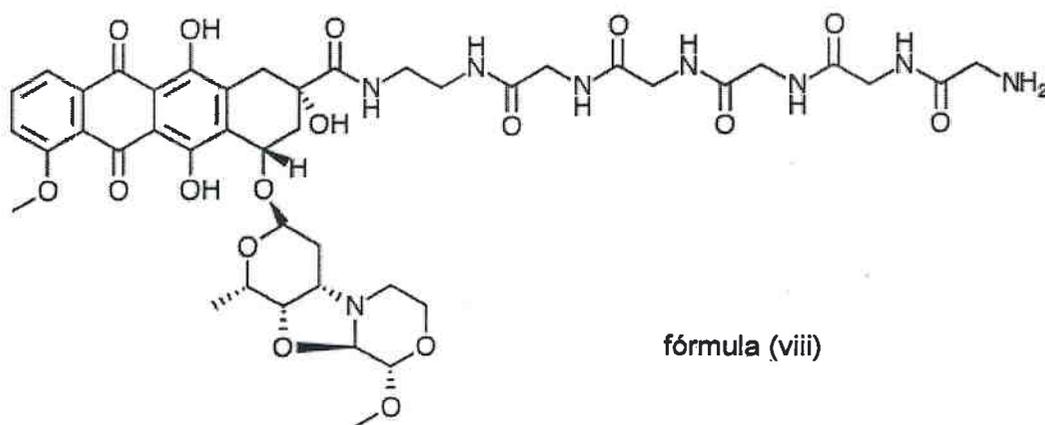


Fig. 1



fórmula (vii)

Fig. 2



fórmula (viii)

Fig. 3 A



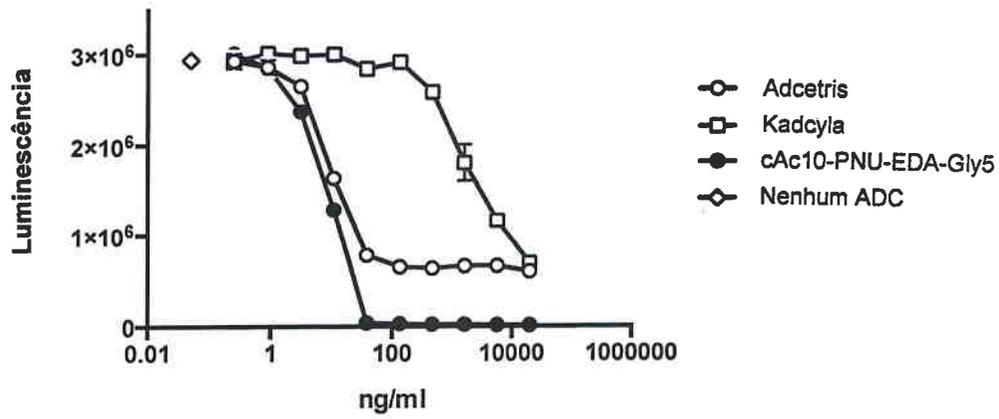
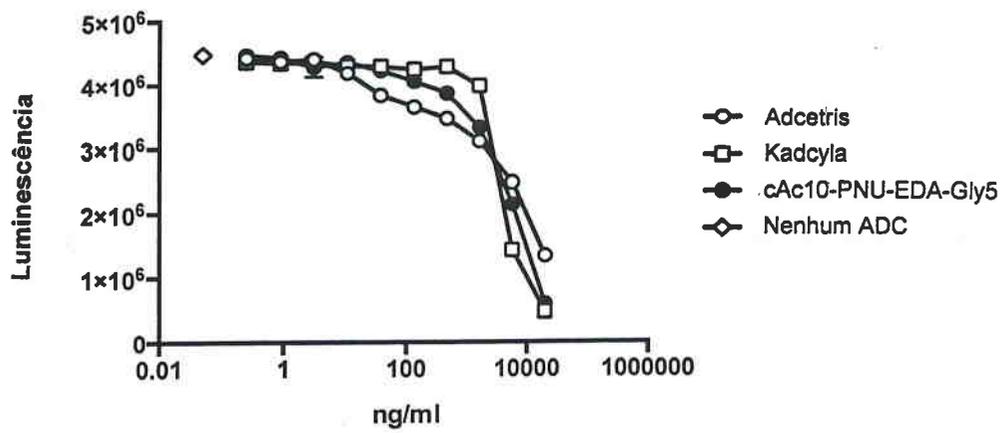
**A****B**

Fig. 4

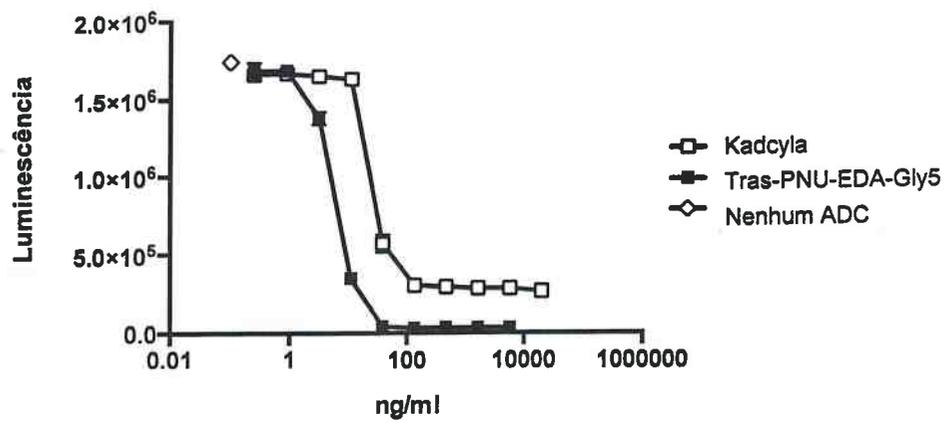
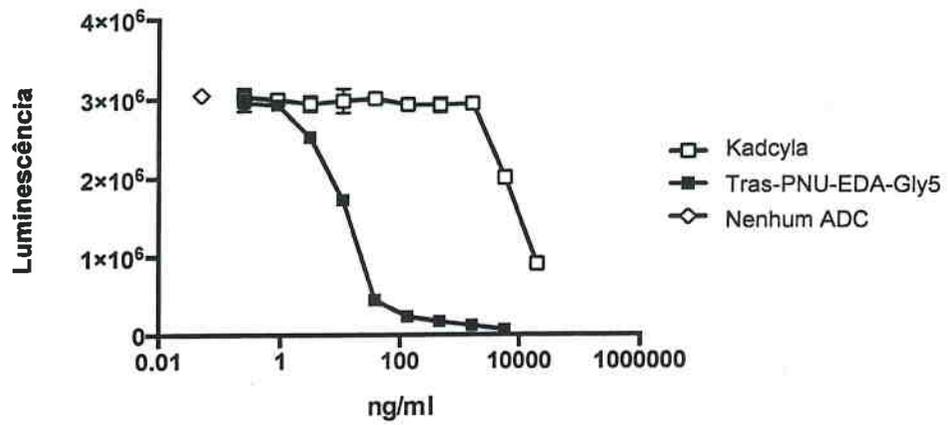
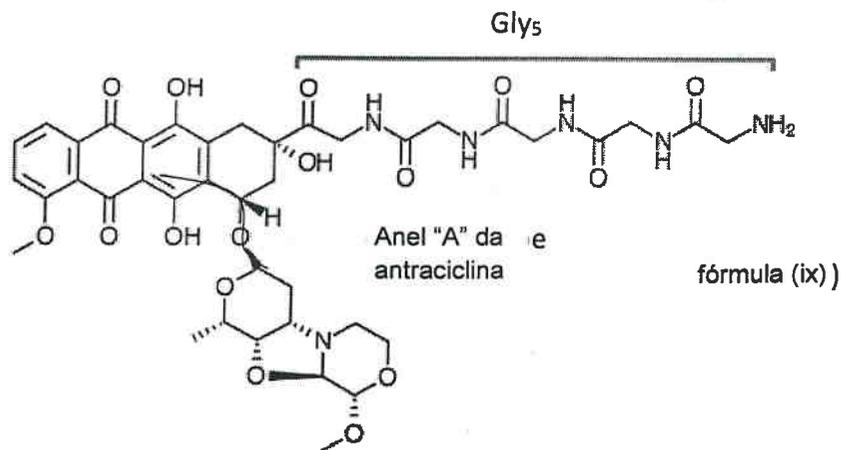
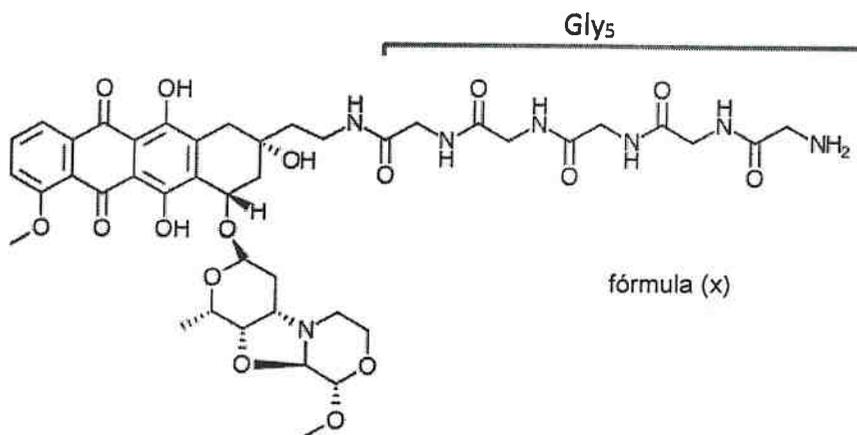
**A****B**

Fig. 5

Fig. 6 A: PNU-Gly<sub>5</sub>Fig. 6 B: PNU-EA-Gly<sub>5</sub>

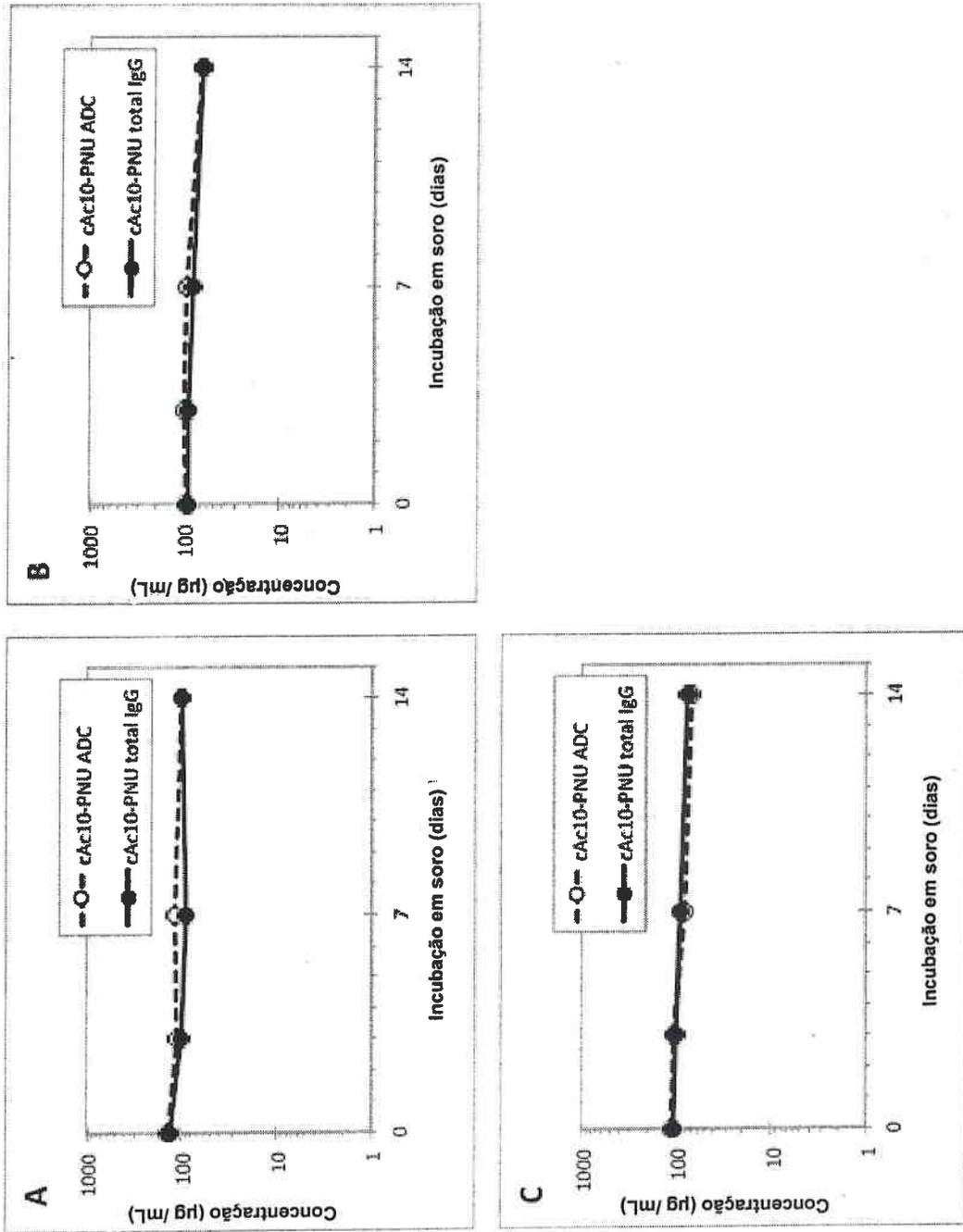


Fig. 7 A

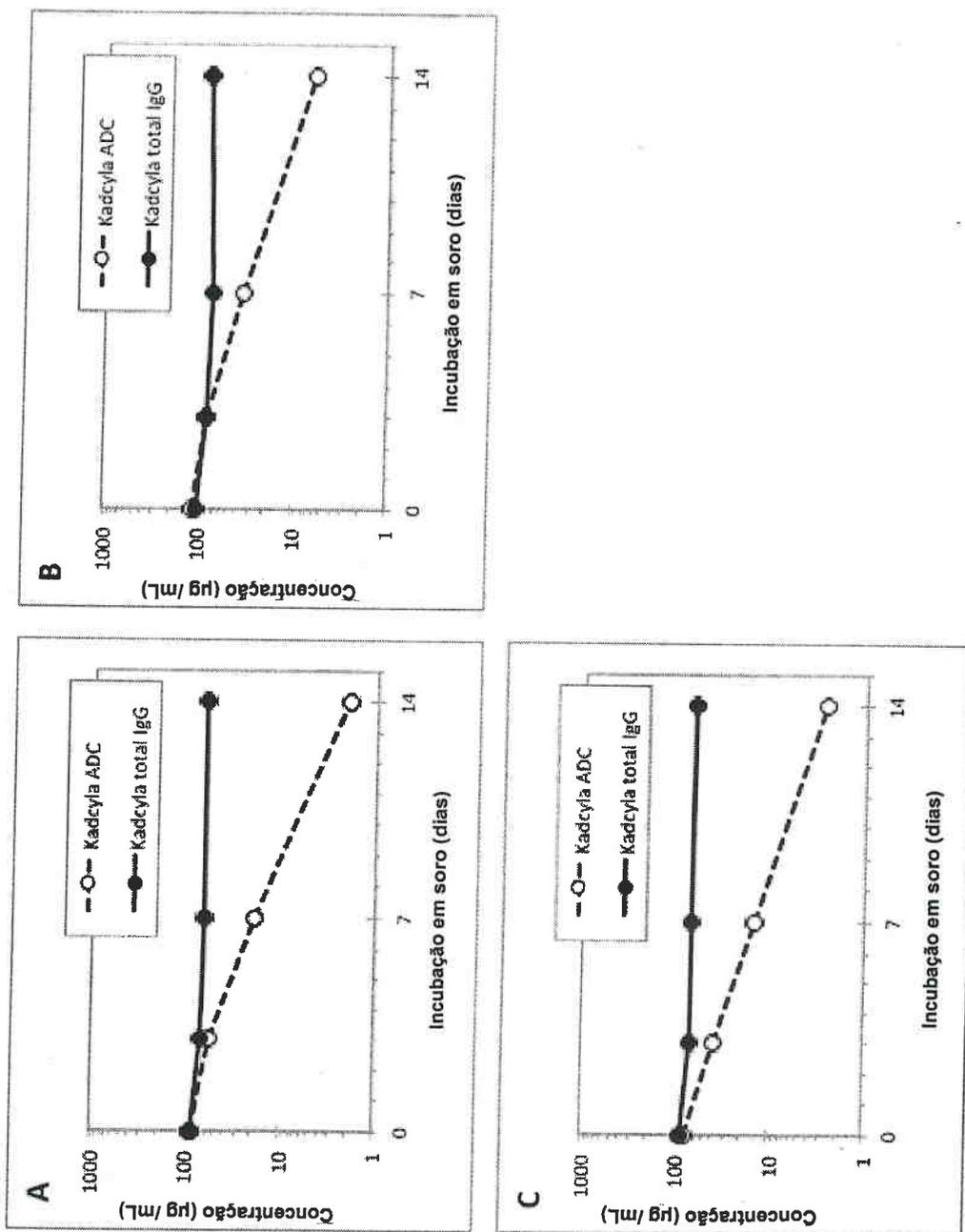


Fig. 7 B

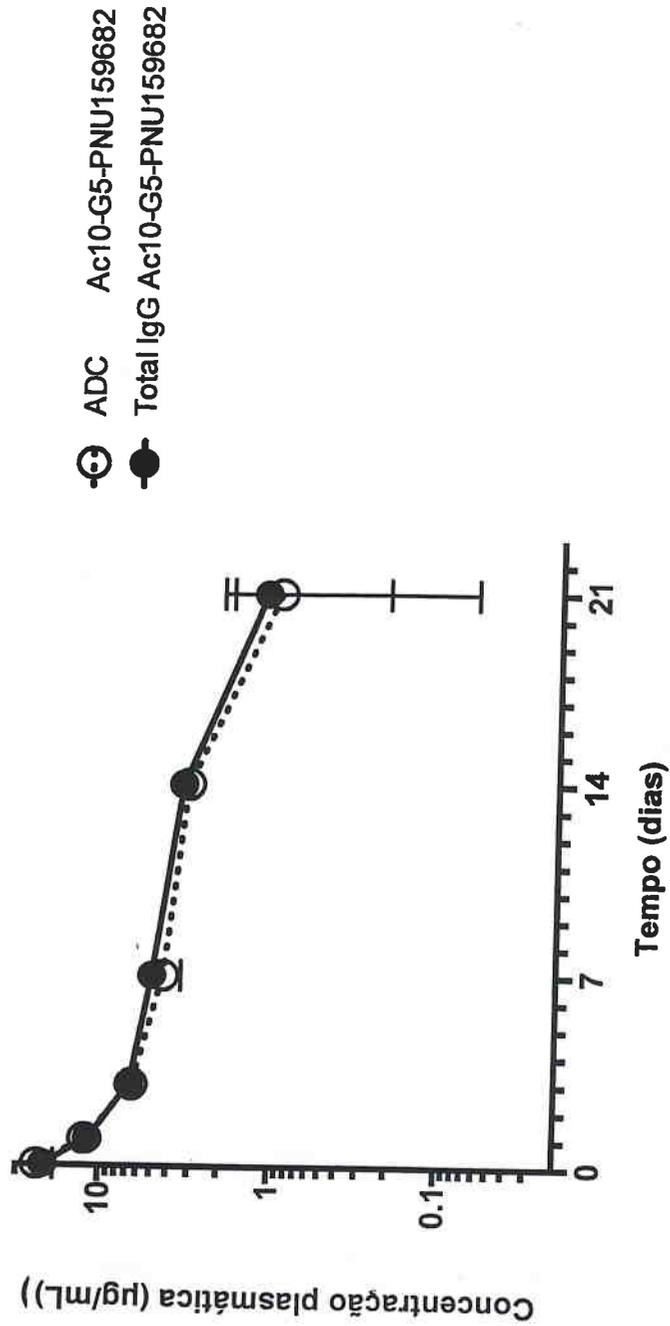


Fig. 8

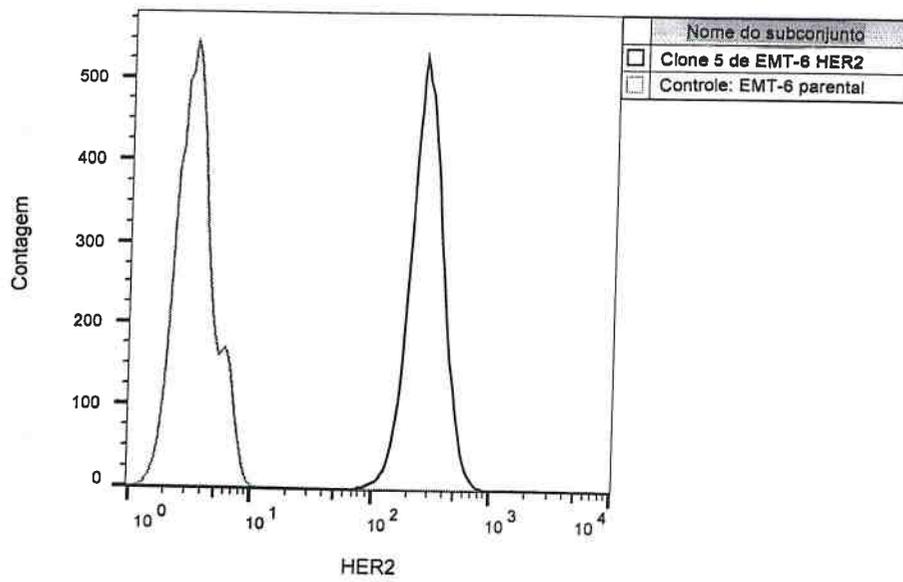


Fig. 9

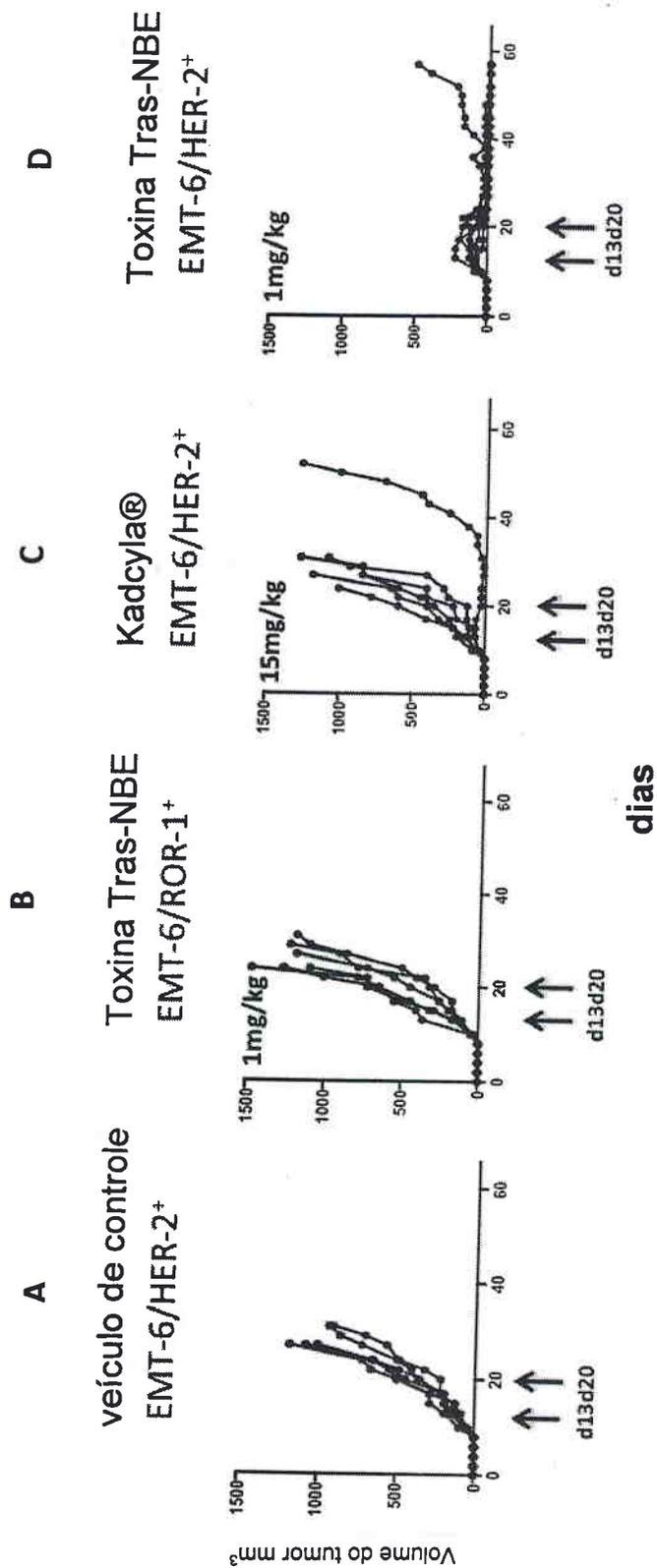


Fig. 10

**Fig. 11 A:**

**Toxina Trastuzumab-HC-LPETGGGGG-PNU**  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV  
 YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGGLYSLSL  
 VVTVPSSSLGQTQYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETGGGGG-PNU-  
toxina

**Toxina Trastuzumab-LC-GGGG-LPETGGGGG-PNU**  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQPEDFATYQCQHYTTTP  
 TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKV  
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSLPETGGGGG-PNU-toxina

**Fig. 11 B****Toxina Brentuximab-HC-LPETGGGG-PNU**

QIQLQQSGPEVWKPGASVKISCKASGYTFTDYITWVKQKPGQGLEWIGWYIPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSTAFMQLSSLTSED  
 AVYFCANYGNWYWFAYWGGTQVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVTVPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETG  
GGGG-PNU-toxina

**Toxina Brentuximab-LC-GGGG-LPETGGGG-PNU**

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSYMNWYQQKPKVLIYAASNLESVIPARFSGSGGDTFLNIHPVEEEDAATYYC  
 QQSNEDPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST  
 LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSLPETGGGG-PNU-toxina