

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 376**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 15/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2013** **E 21171679 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023** **EP 3912642**

54 Título: **Anticuerpo modificado, conjugado de anticuerpo y proceso de preparación de los mismos**

30 Prioridad:

23.10.2012 EP 12189604

23.10.2012 US 201261717187 P

14.10.2013 EP 13188607

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2023

73 Titular/es:

SYNAFFIX B.V. (100.0%)

Kloosterstraat 9

5349 AB Oss, NL

72 Inventor/es:

VAN DELFT, FLORIS LOUIS;

VAN GEEL, REMON y

WIJDEVEN, MARIA ANTONIA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

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

ES 2 949 376 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo modificado, conjugado de anticuerpo y proceso de preparación de los mismos

5 **Campo técnico de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos modificados, en particular a anticuerpos modificados con uno o más grupos azida conjugados con una molécula de interés para formar un conjugado de anticuerpo. Dicha molécula de interés es una sustancia activa. La invención, por lo tanto, también se refiere a conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).

Antecedentes de la invención

[0002] Los conjugados de anticuerpos, es decir anticuerpos conjugados a una molécula de interés mediante un enlazador, se conocen en la técnica. Hay gran interés por conjugados de anticuerpos donde la molécula de interés es un fármaco, por ejemplo, una sustancia química citotóxica. Los conjugados anticuerpo-fármaco se conocen en la técnica y constan de un anticuerpo recombinante enlazado de manera covalente a una sustancia química citotóxica mediante un enlazador sintético (S.C. Alley *et al*, Curr. Opin. Chem. Biol. 2010, 14, 529-537). El objetivo principal de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), también llamado inmunotoxina, es combinar la elevada especificidad de un anticuerpo monoclonal para un antígeno asociado a un tumor con la potencia farmacológica de un "pequeño" fármaco citotóxico (típicamente de 300 a 1,000 Da). Los ejemplos de ADC incluyen gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg; anti-CD33 mAb conjugado a calicheamicina, Pfizer/Wyeth); brentuximab vedotina (SGN-35, Adcetris, un ADC que actúa sobre CD30 que consta de brentuximab, enlazado de manera covalente a MMAE (monometilauristatina), Seattle Genetics); conjugado trastuzumab-DM1 (T-DM1). Un avance en el campo incluye la emergencia de toxinas extremadamente potentes, en particular taxanos, calicheamicinas, maitansinas, pirrolobenzodiazepinas, duocarmicinas y auristatinas. La baja toxicidad de nanomolar a picomolar de estas sustancias es una mejora del conductor principal sobre las toxinas aplicadas anteriores. Otro avance tecnológico importante implica el uso de enlazadores optimizados que son hidrolizables en el citoplasma, resistentes o susceptibles a las proteasas, o resistentes a las bombas de flujo de resistencia a multifármaco que se asocian con fármacos altamente citotóxicos.

[0003] Los ADC conocidos del estado de la técnica se preparan comúnmente por conjugación de la toxina del enlazador a la cadena lateral del aminoácido lisina o cisteína del anticuerpo, por acilación o alquilación, respectivamente. Para las lisinas, la conjugación tiene lugar preferentemente en cadenas laterales de lisina con la máxima accesibilidad estérica, la mínima pKa, o una combinación de las mismas. La desventaja de este método es que el control del sitio de la conjugación es bajo.

[0004] Un mejor control de la especificidad del sitio se obtiene mediante la alquilación de cisteínas, basado en el hecho de que típicamente no hay cisteínas libres presentes en un anticuerpo, ofreciendo así la opción de alquilar solo aquellas cisteínas que se liberan selectivamente mediante un paso reductivo o diseñadas específicamente en el anticuerpo como cisteínas libres (como en los así denominados Thiomab). La liberación de cisteína selectiva mediante reducción se realiza típicamente mediante tratamiento del anticuerpo entero con un agente reductor (por ejemplo, TCEP o DTT), lo que conduce a la conversión de un enlace de disulfuro en dos tioles libres (en su mayoría en la región de bisagra del anticuerpo). Los tioles liberados se alquilan luego con un reactivo electrofílico, típicamente basados en una maleimida fijada a una toxina del enlazador, lo que transcurre generalmente rápido y con alta selectividad. Respecto a la ingeniería de una cisteína (libre) adicional en un anticuerpo, el control del sitio mejorado se logra con respecto a la ubicación de la(s) cisteína(s) adicionada(s) y no se requiere ningún paso reductivo, evitando así idealmente múltiples escisiones de enlaces de disulfuro y alquilación múltiple. También en esta estrategia, la alquilación de cisteínas libres se efectúa con química de maleimida, pero no se logra una homogeneidad completa.

[0005] Al mismo tiempo, una desventaja de los ADC obtenidos mediante alquilación con maleimidas es que en general los conjugados resultantes son inestables debido a la reversión de la alquilación, es decir una reacción de retro-Michael, que conduce así a la liberación de la toxina del enlazador del anticuerpo. La conjugación basada en alquilación de cisteína-maleimida claramente no es una tecnología ideal para desarrollos de ADC que preferiblemente no deberían mostrar liberación prematura de toxina.

[0006] Se conoce en la técnica que las azidas (grupos N₃, también referidos como grupos azida) pueden sufrir cicloadición selectiva con alquinos terminales (catalizados con cobre) o con alquinos cíclicos (en virtud de la tensión anular). Los triazoles resultantes de la reacción con alquinos no son susceptibles a hidrólisis u otras vías de degradación. También se conoce en la técnica que las cetonas pueden sufrir conjugación selectiva con

hidroxilaminas o hidracinas, dando como resultado respectivamente oximas o hidrazonas. Las oximas e hidrazonas son también relativamente inertes en condiciones neutrales, pero pueden sufrir hidrólisis a bajo pH.

[0007] Diferentes métodos para la introducción de una azida en una proteína se han revisado recientemente por van Delft *et al.*, ChemBioChem. 2011, 12, 1309: (a) reacción de transferencia de diazo quimioslectivo, (b) conversión enzimática, (c) expresión en bacterias auxotróficas y (d) codificación genética. Las reacciones de transferencia de diazo quimioslectivo (a) tienen aplicabilidad limitada para los anticuerpos, ya que típicamente ocurren en un N-terminal de la proteína, mientras que en un anticuerpo los N-terminales de la cadena tanto ligera como pesada están en la región de unión del anticuerpo. La expresión en bacterias auxotróficas (c) y la codificación genética (d) son, aunque potentes, estrategias muy complejas para laboratorios no especializados y además no se pueden usar para la postmodificación directa de anticuerpos recombinantes existentes y no son, por lo tanto, generalmente aplicables.

[0008] Con respecto a la conversión enzimática de proteínas (b), se han proporcionado diversas enzimas durante estos últimos años capaces de alcanzar tal transformación con sustratos antinaturales que contienen azida, por ejemplo, transglutaminasa, ligasa de ácido lipoico, sortasa, FGE y otros (revisado en Bertozzi *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 6974). Sin excepción, sin embargo, estas enzimas requieren secuencias de reconocimiento específicas en la proteína, que necesitan ser diseñadas específicamente, y la conjugación se puede restringir a los terminales de la proteína.

[0009] Una estrategia potencialmente versátil que puede ser aplicable generalmente a todos los anticuerpos monoclonales implica la conjugación enzimática específica al glicano fijado a Fc, que está presente naturalmente en todos los anticuerpos expresados en cultivos celulares de mamíferos (o levadura). Diferentes estrategias basadas en este concepto se conocen en la técnica, como mediante oxidación de la galactosa terminal o mediante transferencia de ácido siálico (antinatural) a la misma fracción de galactosa. Sin embargo, para el fin de los ADC, tal estrategia es subóptima, porque los glicanos se forman siempre como una mezcla compleja de isoformas, que pueden contener niveles diferentes de galactosilación (G0, G1, G2) y, por lo tanto, proporcionaría ADC con pobre control de la proporción fármaco-anticuerpo (DAR, véase a continuación).

[0010] La figura 1 muestra un anticuerpo que comprende un glicano en cada cadena pesada. Estos glicanos están presentes en isoformas diferentes respecto a la galactosilación (G0, G1 y G2) y la fucosilación (G0F, G1F y G2F).

[0011] En WO 2007/133855 (University of Maryland Biotechnology Institute), se describe un método quimioenzimático para la preparación de una glicoproteína o glicopéptido homogéneo, que implica una estrategia de dos pasos que provoca primero el recorte del árbol de glicano casi completo (bajo la acción de endo A o endo H) que deja solo la fracción de N-acetilglucosamina central (GlcNAc) (la así denominada proteína GlcNAc), seguido de un evento de reglicosilación donde, en presencia de un catalizador que comprende endoglicosidasa (ENGasa), una fracción de oligosacárido se transfiere a la proteína de GlcNAc para producir una glicoproteína o glicopéptido homogéneo. Se describe una estrategia para glicoproteínas funcionalizadas con azida, donde una proteína GlcNAc se reacciona en presencia de ENGasa con una oxazolina tetrasacárida que contiene dos fracciones de 6-azidomanosa, introduciendo así dos azidas simultáneamente en el glicano. La glicoproteína funcionalizada con azida puede luego reaccionarse catalíticamente en una reacción de cicloadición de "química click", en presencia de un catalizador (por ejemplo, un catalizador Cu(I)) con un alquino terminal que soporta una fracción funcional X de interés. No se divulgan ejemplos reales de dicha química click.

[0012] En J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 13790, Wang *et al.* divulgan una fijación doble eficaz de un trisacárido modificado con alquino terminal a ribonucleasa B modificada con bis-azida por química click catalizada con cobre.

[0013] En J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8030, Davis *et al.* revelan la transferencia de oxazolinas de oligosacárido en un dominio de GlcNAc-Fc central fucosilada al igual que no fucosilada de anticuerpos intactos, en presencia de glicosintasa EndoS.

[0014] En J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308, Wang *et al.* revelan la transferencia de una oxazolina tetrasacárida que contiene dos fracciones de 6-azidomanosa en el dominio de GlcNAc-Fc fucosilada al igual que no fucosilada de anticuerpos intactos (Rituximab) en presencia de mutantes de glicosintasa EndoS-D233A y EndoS-D233Q. Este proceso se muestra esquemáticamente en la figura 2 y produce un anticuerpo que comprende cuatro grupos azida. La conjugación posterior del IgG modificado con azida con química click se menciona, pero no se describe.

[0015] Sin embargo, una desventaja de las estrategias de glicosintasa descritas en WO 2007/133855, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8030 y J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308 es la síntesis larga y compleja de las oxazolininas de oligosacárido que contienen azida requeridas. Además, las oxazolininas de oligosacárido que contienen azida

comprenden dos grupos azida. Hasta la fecha, no se ha mostrado si este proceso puede ser adecuado para la introducción de solo un grupo azida en el glicano de un anticuerpo.

[0016] Qasba *et al.* revelar en J. Biol. Chem. 2002, 277, 20833, que las galactosiltransferasas mutantes GalT(Y289L), GalT(Y289I) y GalT(Y289N) pueden unir enzimáticamente GalNAc a un azúcar GlcNAc no reductor (β -bencil-GlcNAc).

[0017] WO 2004/063344 (National Institutes of Health) divulga galactosiltransferasas mutantes GalT(Y289L), GalT(Y289I) y GalT(Y289N). Se describe un proceso donde glicanos complejos tales como los de los anticuerpos monoclonales (Rituxan, Remicade, Herceptin) se convierten primero en glicanos G0 en anticuerpos mediante tratamiento con galactosidasa para eliminar toda la galactosa terminal de la cadena. Estos anticuerpos G0 se someten posteriormente a GalNAc-UDP en presencia de GalT(Y289L), lo que conduce a anticuerpos con estructuras de glicano significativamente más homogéneas. Qasba *et al.* revelan en Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1228 que el proceso descrito en WO 2004/063344 también procede para variantes antinaturales de GalNAc-UDP sustituidas en el grupo N-acetil. Anticuerpos monoclonales tratados con β -Galactosidasa con una glicoforma G0 se galactosilan completamente a la glicoforma G2 después de la transferencia de una fracción de galactosa que comprende una fracción de azidoacetamida sustituida en C2 (GalNAz) a los residuos GlcNAc terminales del glicano, lo que conduce a anticuerpos sustituidos con tetraazido, es decir, dos fracciones GalNAz por cadena pesada. Este proceso se muestra esquemáticamente en la figura 3. La conjugación de dichos anticuerpos sustituidos con tetraazido a una molécula de interés no se describió. La transferencia de una fracción de galactosa que comprende un grupo ceto sustituido en C2 (C2-ceto-Gal) a los residuos GlcNAc terminales de un glicano de glicoforma G0, así como también se describe el enlace de C2-ceto-Gal a aminooxi biotina. En cualquier caso, se usa mutante GalT(Y289L) para la transferencia de GalNAc-UDP (o GalNAz-UDP) a los anticuerpos, pero no se describe el uso de mutantes GalT(Y289N) o GalT(Y289I).

[0018] Una desventaja del método descrito en WO 2004/063344 y Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1228 es que la conjugación de los anticuerpos sustituidos con tetraazido a una molécula de interés llevaría a un conjugado de anticuerpo con típicamente dos moléculas de interés por glicano (siempre que dicha conjugación procediera con conversión completa). En algunos casos, por ejemplo, cuando la molécula de interés es una toxina lipofílica, no se desea la presencia de demasiadas moléculas de interés por anticuerpo, ya que esto puede llevar a la formación de agregado (BioProcess International 2006, 4, 42-43).

[0019] WO 2007/095506 y WO 2008/029281 (Invitrogen Corporation) revelan un método de formación de un conjugado de glicoproteína donde la glicoproteína está en contacto con UDP-GalNAz en presencia de mutante GalT(Y289L), lo que conduce a la incorporación de GalNAz en una GlcNAc no reductora terminal de un carbohidrato de un anticuerpo. La posterior química click catalizada con cobre con un alquino terminal o ligadura de Staudinger puede después usarse para conjugar una molécula indicadora, soporte sólido o molécula portadora a la fracción de azida unida. WO 2007/095506 y WO 2008/029281 revelan además que, si ningún azúcar GlcNAc terminal está presente en el anticuerpo, se pueden usar enzimas Endo H, Endo A o Endo M para generar una cadena truncada que termina con un residuo de N-acetilglucosamina.

[0020] Los conjugados de anticuerpos conocidos en la técnica generalmente tienen varias desventajas. Para conjugados anticuerpo-fármaco, una medida para la carga del anticuerpo con una toxina se da mediante la proporción de fármaco-anticuerpo (DAR), que da el número medio de moléculas de sustancia activas por anticuerpo. Sin embargo, la DAR no da ninguna indicación con respecto a la homogeneidad de tal ADC.

[0021] Los procesos de preparación de un conjugado de anticuerpo conocidos del estado de la técnica dan lugar generalmente a un producto con una DAR de entre 1,5 y 4, pero, de hecho, tal producto comprende una mezcla de conjugados de anticuerpos con un número de moléculas de interés que varía de 0 a 8 o más alto. En otras palabras, los conjugados de anticuerpos conocidos del estado de la técnica se forman generalmente con una DAR con alta desviación típica.

[0022] Por ejemplo, la gemtuzumab ozogamicina es una mezcla heterogénea de 50 % de conjugados (de 0 a 8 fracciones de calicheamicina por moléculas de IgG con un promedio de 2 o 3, enlazadas de forma aleatoria a residuos de lisilo expuestos solventes del anticuerpo) y 50 % de anticuerpo no conjugado (Bross *et al.*, Clin. Cancer Res. 2001, 7, 1490; Labrijn *et al.*, Nat. Biotechnol. 2009 27, 767). Sin embargo, también para la brentuximab vedotina, T-DM1, y otros ADC en la clínica, sigue sin poder controlarse exactamente cuántos fármacos se unen a cualquier anticuerpo en concreto (proporción de fármaco-anticuerpo, DAR) y el ADC se obtiene como una distribución estadística de conjugados. Si el número óptimo de fármacos por anticuerpo es por ejemplo dos, cuatro o más, unirlos en un número previsible y en ubicaciones específicas de sitio a través de conjugación específica del sitio con una pequeña desviación típica sigue siendo problemático.

Resumen de la invención

[0023] La presente invención se refiere a un conjugado de anticuerpo para su uso como medicamento, donde el conjugado de anticuerpo se puede obtener mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquilino y uno o más sustancias que son farmacéuticamente activas, donde dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x, donde GlcNAc es una N-acetilglucosamina, donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azido y x es 1, 2, 3 o 4, donde dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x está unido al anticuerpo a través de C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x, donde dicha N-acetilglucosamina está opcionalmente fucosilada, donde la una o más sustancias que son farmacéuticamente activas son citotoxinas y donde el anticuerpo se une específicamente al antígeno del cáncer.

[0024] El anticuerpo modificado, el conjugado de anticuerpo y los procesos de preparación de los mismos tienen diferentes ventajas sobre los procesos, los anticuerpos modificados y los conjugados de anticuerpos conocidos en la técnica.

[0025] Como se describió anteriormente, los procesos conocidos para la conjugación de unas entidades de toxina del enlazador a anticuerpos todavía necesitan mejorarse, en cuanto al control tanto de especificidad del sitio como de estequiometría. A pesar de la capacidad de los ADC para alojarse en sus objetivos, la cantidad de fármaco estimada que se introduce en las células de los tumores es típicamente < 2 % de una dosis administrada. Este problema se amplifica por los resultados de conjugación imprevisibles de los ADC conocidos en la técnica. Resulta importante evitar anticuerpos infraconjugados, que reducen la potencia, así como especies altamente conjugadas, que pueden tener vidas medias de circulación fuertemente disminuidas, unión deficiente a la proteína objetivo y toxicidad aumentada.

[0026] Para conjugados fármaco-anticuerpo, una medida para la carga de moléculas de interés (por ejemplo, fármacos, sustancias activas) en el anticuerpo es la así llamada proporción de fármaco-anticuerpo (DAR), que da el número medio de moléculas de sustancia activas por anticuerpo, calculado a partir de una distribución estadística. El valor máximo teórico de la DAR para un tipo determinado de ADC es igual al número de sitios de anclaje. Como se describió anteriormente, los procesos de preparación de ADC conocidos del estado de la técnica suponen generalmente un producto que comprende una mezcla de conjugados de anticuerpos con un número variable de moléculas de interés presentes en cada conjugado de anticuerpo, y una DAR con una desviación típica alta.

[0027] Una de las ventajas de la invención es que estos anticuerpos y conjugados de anticuerpos son homogéneos, tanto en especificidad de sitio como en estequiometría. Dichos anticuerpos modificados y conjugados de anticuerpos se obtienen con una DAR muy cercana al valor teórico, y con una desviación típica muy baja. Esto también significa que los conjugados de anticuerpos para su uso según la invención suponen un producto más consistente para el análisis preclínico.

[0028] En una forma de realización preferida, el anticuerpo modificado y el conjugado de anticuerpo son homogéneos, tanto en especificidad del sitio como en estequiometría. Aquí, un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo se considera homogéneo cuando la conjugación se efectúa solo en un sitio predeterminado y con una proporción de fármaco-anticuerpo predeterminada. Un conjugado de anticuerpo es heterogéneo cuando la conjugación del anticuerpo tiene lugar en sitios diferentes en el anticuerpo, lo que conduce a una mezcla de productos con proporción de fármaco-anticuerpo imprevisible. En este último caso, la proporción de fármaco-anticuerpo será un promedio del grupo entero de conjugados fármaco-anticuerpo.

[0029] En otra forma de realización preferida, el conjugado de anticuerpo tiene una DAR que está dentro del 10 % de su valor teórico.

[0030] Otra ventaja de los procesos y los anticuerpos implica la reducción de residuos en la fabricación, mejorando así el coste de los productos de las empresas.

[0031] Además, cuando un anticuerpo modificado con azida se acopla a un conjugado de enlazador que comprende un grupo alquilino a través de una reacción de cicloadición, los triazoles resultantes no son susceptibles a la hidrólisis ni a otras vías de degradación.

[0032] Las ventajas adicionales son, por tanto, la estabilidad de los conjugados de anticuerpo, así como el proceso directo y generalmente aplicable para la introducción de un grupo azida en un anticuerpo.

[0033] Como se describió anteriormente, la conjugación enzimática de un azúcar antinatural a la GlcNAc terminal de un glicano oligomérico fijado a un anticuerpo, en presencia de galactosiltransferasa Y289L mutante, como se mostró en la figura 3, se conoce en la técnica.

[0034] Hasta la fecha, sin embargo, la idoneidad de las galactosiltransferasas mutantes conocidas en la técnica para la transferencia de nucleótidos de azúcar o nucleótidos de derivado de azúcar a un sustituyente GlcNAc *central* en un anticuerpo, y la idoneidad de tal estrategia para la generación de conjugados de anticuerpo, no se han demostrado todavía. En los procesos conocidos en el estado de la técnica, un nucleótido de azúcar o nucleótido de derivado de azúcar se transfiere a una GlcNAc terminal de un glicano de oligo o polisacárido unido a un anticuerpo.

[0035] Además, hasta la fecha, la idoneidad de las galactosiltransferasas mutantes conocidas en la técnica para la transferencia de nucleótidos de azúcar o nucleótidos de derivado de azúcar a azúcares *internos* y derivados de azúcar no se ha demostrado. Con los procesos actuales, ahora es posible transferir un derivado de azúcar que comprende uno o más grupos azida, ceto y/o alquino, a un sustituyente GlcNAc central presente en un anticuerpo, con independencia de si dicha GlcNAc está fucosilada o no. Ventajosamente, la eliminación de la fucosa antes del proceso no es, por lo tanto, necesaria, ya que se puede utilizar una mezcla de anticuerpos que comprende tanto los sustituyentes GlcNAc central como GlcNAc(Fuc) central en el proceso.

Descripción de las figuras

[0036]

La figura 1 muestra glicoformas diferentes de glicanos de anticuerpo G2F, G1F, G0F, G2, G1 y G0.

La figura 2 muestra un proceso para la transferencia de un tetrasacárido que comprende dos grupos azida a un sustituyente GlcNAc central en presencia de EndoS-D233A mutante, que resulta en un anticuerpo modificado que comprende cuatro grupos azida, como se describe en J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308.

La figura 3 muestra un proceso para la transferencia de GalNAz a los residuos de GlcNAc terminales de un glicano de anticuerpo, que conduce a un anticuerpo modificado que comprende cuatro grupos azida, como se describe en Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1228.

La figura 4 muestra una forma de realización preferida del proceso de preparación de un anticuerpo modificado con azida, donde un anticuerpo opcionalmente sustituido que comprende un sustituyente GlcNAc central se reacciona con GalNAz-UDP en presencia de GalT Y289L como un catalizador.

La figura 5 muestra la desglicosilación de una mezcla de glicoformas en presencia de EndoS como un catalizador.

La figura 6 muestra una forma de realización preferida del proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo, donde un anticuerpo modificado con azida se conjuga a un conjugado de enlazador que comprende una o más moléculas de interés.

La figura 7 muestra el esquema de reacción de la síntesis de conjugados BCN-doxorrubicina de enlazador no escindible **28a** y **28b**.

La figura 8 muestra el esquema de reacción para la síntesis de conjugado DIBAC-biotina **30**.

La figura 9 muestra el esquema de reacción de la síntesis de conjugado BCN-vc-PABA-doxorrubicina de enlazador escindible **33** empezando a partir de Fmoc-citrulina **31**.

La figura 10a muestra el esquema de reacción para la síntesis de conjugados de BCN escindible a vc-PABA-MMAE (**37a**), vc-PABA-MMAF (**37b**), conjugado BCN-MMAF no escindible (**38**), conjugado BCN-vc-PABA-maitansinoide escindible (**38**) y conjugado maleimida-vc-PABA-maitansinoide (**40**).

La figura 10b muestra la estructura del conjugado BCN-MMAF no escindible **57**.

La figura 11 muestra el esquema de reacción para la síntesis de DIBAC-vc-PABA-MMAF escindible **41**.

La figura 12 muestra el esquema de reacción para la síntesis de tres conjugados ciclooctino-doxorrubicina **42-44**.

La figura 13 muestra las estructuras de tres reactivos biotinilados funcionalizados **45-47**.

La figura 14 muestra el esquema de reacción para la síntesis de derivados de UDP-GalNAc modificados en 2 **52-54** y las estructuras de UDP-Gal (**55**) y UDP-GalNAc (**56**) modificadas con 6-azida.

La figura 15 muestra el perfil MS de (A) trastuzumab, (B) trastuzumab después del recorte con endo S, (C) después de galactosiltransferasa con UDP-GalNAz **52** y (D) después de conjugación con BCN-MMAF **37b**.

La figura 16 muestra el perfil MS de IgG de plasma agrupado (A), después del recorte con endo S (B) y después de galactosiltransferasa con UDP-GalNAz **52** (C).

La figura 17 muestra el perfil MS de trastuzumab recortado con endo S, luego galactosiltransferasa con UDP-GalNAz **52** y finalmente mediante conjugación catalizada con cobre con alquino-biotina **45**.

La figura 18 muestra el perfil MS de trastuzumab recortado con endo S, (A) después de galactosiltransferasa con UDP-GalNAc-ina **53** y (B) después de conjugación catalizada con cobre con azida-biotina **46**, que conduce a un 50 % de conversión.

La figura 19 muestra el perfil MS perfil de trastuzumab recortado con endo S, (A) después de galactosiltransferasa con UDP-GalNLev **55** y (B) después de conjugación de oxima con hidroxilamina-biotina **47**.

La figura 20 muestra el SDS-PAGE bajo condiciones de reducción (vía 1-4) o condiciones no reductoras (vía 5-8) de trastuzumab (vía 1 y 5), trastuzumab después del recorte y galactosiltransferasa con UDP-GalNAz **52** (vía 2 y 6), conjugado de trastuzumab obtenido por tratamiento de trast(GalNAz)₂ con BCN-biotina **25** (vía 3 y 7) y conjugado de trastuzumab obtenido por tratamiento de trast(GalNAz)₂ con alquino-biotina **45** tras reacción de click catalizada con Cu(I) (vía 4 y 8). Diferentes bandas en la mediante 4 y 8 indican la formación de fragmentos covalentes y/o reducidos formados, así como agregación, como resultado de la conjugación de click catalizada con cobre, que están todos ausentes de la conjugación promovida por tensión en la mediante 3 y 7.

La figura 21 muestra el cromatograma de exclusión de tamaño del conjugado de trastuzumab(MMAF)₂ derivado de trastuzumab(GalNAz)₂ y BCN-MMAF **37b**.

La figura 22 muestra el perfil MS dependiente del tiempo de trastuzumab(doxorrubicina)₂ derivada de **28a**, en plasma humano mermado de IgG.

La figura 23 muestra el nivel de agregación de diferentes mAb o ADC no tratados o tras 5 ciclos de congelación-descongelación.

La figura 24 muestra la citotoxicidad *in vitro* de un rango de ADC en la línea celular SK-BR-3.

La figura 25 muestra la citotoxicidad *in vitro* de un rango de ADC en la línea celular SK-OV-3.

La figura 26 muestra la citotoxicidad *in vitro* de un rango de ADC en la línea celular (control) MDA-MB-231.

La figura 27 muestra el espacio libre sanguíneo de trastuzumab(MMAF)₂ marcado con ¹¹¹In derivado de **37b**, trastuzumab(maitansinoide)₂ derivado de **39**, trastuzumab desglucosilado (obtenido mediante recorte de endo S de trastuzumab) y trastuzumab nativo.

La figura 28 muestra la biodistribución de trastuzumab(MMAF)₂ marcado con ¹¹¹In derivado de **37b**, trastuzumab(maitansinoide)₂ derivado de **39**, trastuzumab desglucosilado (obtenido mediante recorte de endo S de trastuzumab) y trastuzumab nativo. Se inyectó a ratones 25 µg y se disecaron 21 d después de la inyección.

La absorción del tejido se expresa como % DI/g.

La figura 29 muestra la eficacia *in vivo* de un modelo de xenoinjerto de ratón. Los ADC que se evaluaron fueron trastuzumab conugado con N297 a vc-maitansinoide (3 mg/kg y 9 mg/kg) y se compararon con T-DM1 (9 mg/kg). Un modelo (PDX) de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer se eligió mediante implantación subcutánea de código de tumor (HBx-13B) en ratones SHO hembra. Los tumores se midieron en el día 0, 4, 7, 11 y 14.

La figura 30 muestra la eficacia *in vivo* de un modelo de xenoinjerto de ratón. Los ADC que se evaluaron fueron trastuzumab conjugado con N297 a vc-maitansinoide (3 mg/kg y 9 mg/kg), trastuzumab conjugado con N297 a vc-MMAF (3 mg/kg y 9 mg/kg) y se compararon con T-DM1 (9 mg/kg). Un modelo (PDX) de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer se eligió mediante implantación subcutánea de código de tumor (HBx-13B) en ratones SHO hembra. Los tumores se midieron en el día 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 21 para ADC de vc-maitansinoide, T-DM1 y vehículo y en el día 0, 3, 7 y 10.

La figura 31 muestra el análisis de espectros de masas detallado de especies de proteína intacta (nanoLC-MS) que usa nanoLC acoplado a resolución ultra elevada QTOF MS (maXis 4G) de la cadena ligera (LC) de (A) trastuzumab nativo, (B) trast(GalNAz)₂, (C) trast(GalNAz)₂ después de conjugación con BCN-biotina **25** y (D) trast(GalNAz)₂ después de conjugación catalizada con cobre con alquino-biotina **45**. Mientras que el valor máximo de base es idéntico para (A)-(C), el conjugado de trastuzumab formado bajo catálisis con cobre (D) muestra un hombro claro a 23441,5 y otro a 23459,5, lo que indica la formación de cantidades significativas (> 20 %) de productos secundarios oxidados y/o desamidados.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

[0037] El verbo "comprender", como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones y sus conjugaciones, se usa en su sentido no limitativo para significar que los artículos después de la palabra se incluyen, pero los artículos no mencionados específicamente no se excluyen.

[0038] Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de una unidad del elemento estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", por lo tanto, significa normalmente "al menos uno".

[0039] Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden comprender uno o más centros asimétricos, y pueden existir diferentes diastereómeros y/o enantiómeros de los compuestos. La descripción de cualquier compuesto en esta descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye todos los diastereómeros, y derivados de los mismos, a menos que se indique lo contrario. Además, la descripción de cualquier compuesto en esta descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye los enantiómeros individuales, así como cualquier mezcla, racémica o de otro modo, de los enantiómeros, a menos que se indique lo

contrario. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un enantiómero específico, debe entenderse que la invención de la presente aplicación no está limitada a ese enantiómero específico.

[0040] Los compuestos pueden ocurrir en formas tautoméricas diferentes. Se entiende que los compuestos según la invención incluyen todas las formas tautoméricas, a menos que se indique lo contrario. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un tautómero específico, debe entenderse que la invención de la presente aplicación no está limitada a ese tautómero específico.

[0041] Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden existir además como *exo* y *endo* diastereoisómeros. A menos que se indique lo contrario, la descripción de cualquier compuesto en la descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye tanto los *exo* diastereoisómeros individuales como los *endo* diastereoisómeros individuales de un compuesto, así como mezclas de los mismos. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un *endo* o *exo* diastereómero específico, debe entenderse que la invención de la presente aplicación no está limitada a ese *endo* o *exo* diastereómero específico.

[0042] Además, los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden existir como isómeros *cis* y *trans*. A menos que se indique lo contrario, la descripción de cualquier compuesto en la descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye tanto el isómero *cis* individual como el isómero *trans* individual de un compuesto, así como mezclas de los mismos. Como ejemplo, cuando la estructura de un compuesto se representa como un isómero *cis*, debe entenderse que el correspondiente isómero *trans* o las mezclas del isómero *cis* y *trans* no se excluyen de la invención de la presente solicitud. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un isómero *cis* o *trans* específico, debe entenderse que la invención de la presente solicitud no está limitada a ese isómero *cis* o *trans* específico. Los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden existir además como regioisómeros. A menos que se indique lo contrario, la descripción de cualquier compuesto en la descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye los regioisómeros de un compuesto, así como las mezclas de los mismos. Cuando la estructura de un compuesto se representa como un regioisómero específico, debe entenderse que la invención de la presente aplicación no está limitada a ese regioisómero específico.

[0043] Los grupos alquilo no sustituidos tienen la fórmula general C_nH_{2n+1} y pueden ser lineales o ramificados. Los grupos alquilo no sustituidos también pueden contener una fracción cíclica, y tienen así la fórmula general concomitante C_nH_{2n-1} . Opcionalmente, los grupos alquilo se sustituyen por uno o más sustituyentes especificados con más detalle en este documento. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, 2-propilo, t-butilo, 1-hexilo, 1-dodecilo, etc.

[0044] Un grupo ariilo comprende de seis a doce átomos de carbono y puede incluir estructuras monocíclicas y bicíclicas. Opcionalmente, el grupo ariilo se puede sustituir por uno o más sustituyentes especificados con más detalle en este documento. Los ejemplos de grupos ariilo son fenilo y naftilo.

[0045] Un grupo heteroarilo comprende de cinco a doce átomos de carbono donde de uno a cuatro átomos de carbono se sustituyen por heteroátomos seleccionados del grupo que consta de oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. Un grupo heteroarilo puede tener una estructura monocíclica o bicíclica. Opcionalmente, el grupo heteroarilo se puede sustituir por uno o más sustituyentes especificados con más detalle en este documento. Los ejemplos de grupos heteroarilo adecuados incluyen piridinilo, quinoleínilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazolilo, pirrolilo, furanilo, benzofuranilo, indolilo, purinilo, benzoxazolilo, tienilo, fosfolilo y oxazolilo.

[0046] Los grupos arilalquilo y grupos alquilarilo comprenden al menos siete átomos de carbono y pueden incluir estructuras monocíclicas y bicíclicas. Opcionalmente, los grupos arilalquilo y alquilarilo se pueden sustituir por uno o más sustituyentes especificados con más detalle en este documento. Un grupo arilalquilo es por ejemplo bencilo. Un grupo alquilarilo es por ejemplo 4-t-butilfenilo.

[0047] Un grupo alquinilo comprende uno o más enlaces triples de carbono-carbono. Un grupo alquinilo no sustituido que comprende un enlace triple tiene la fórmula general C_nH_{2n-3} . Un alquinilo terminal es un grupo alquinilo donde el enlace triple se localiza en una posición terminal del grupo alquinilo. Opcionalmente, el grupo alquinilo se sustituye por uno o más sustituyentes especificados con más detalle en este documento, y/o se interrumpe con heteroátomos seleccionados del grupo de oxígeno, nitrógeno y azufre. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo, butinilo, octinilo, etc.

[0048] Un grupo cicloalquinilo es un grupo alquinilo cíclico. Un grupo cicloalquinilo no sustituido que comprende un enlace triple tiene la fórmula general C_nH_{2n-5} . Opcionalmente, un grupo cicloalquinilo se sustituye por uno o más sustituyentes especificados con más detalle en este documento. Un ejemplo de un grupo cicloalquinilo es ciclooctinilo.

[0049] Un grupo heterocicloalquinilo es un grupo cicloalquinilo interrumpido por heteroátomos seleccionados del grupo de oxígeno, nitrógeno y azufre. Opcionalmente, un grupo heterocicloalquinilo se sustituye por uno o más sustituyentes especificados con más detalle en este documento. Un ejemplo de un grupo heterocicloalquinilo es azaciclooctinilo.

[0050] Un grupo (hetero)arilo comprende un grupo arilo y un grupo heteroarilo. Un grupo alquil(hetero)arilo comprende un grupo alquilarilo y un grupo alquilheteroarilo. Un grupo (hetero)arilalquilo comprende un grupo arilalquilo y un grupo heteroarilalquilo. Un grupo (hetero)alquinilo comprende un grupo alquinilo y un grupo heteroalquinilo. Un grupo (hetero)cicloalquinilo comprende un grupo cicloalquinilo y un grupo heterocicloalquinilo.

[0051] Un compuesto (hetero)cicloalquino se define aquí como un compuesto que comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo.

[0052] Varios de los compuestos descritos en esta descripción y en las reivindicaciones pueden describirse como compuestos (hetero)cicloalquinos fusionados, es decir, compuestos (hetero)cicloalquinos donde una segunda estructura anular se fusiona, es decir se anilla, al grupo (hetero)cicloalquinilo. Por ejemplo, en un compuesto (hetero)ciclooctino fusionado, un cicloalquilo (por ejemplo, un ciclopropilo) o un areno (por ejemplo, benceno) se puede anillar al grupo (hetero)ciclooctinilo. El enlace triple del grupo (hetero)ciclooctinilo en un compuesto (hetero)ciclooctino fusionado se puede situar en cualquiera de las tres ubicaciones posibles, es decir en la posición 2, 3 o 4 de la fracción de ciclooctino (numeración según "IUPAC Nomenclature of Organic Chemistry", norma A31.2). La descripción de cualquier compuesto (hetero)ciclooctino fusionado en esta descripción y en las reivindicaciones se entiende que incluye los tres regioisómeros individuales de la fracción de ciclooctino.

[0053] Cuando un grupo alquilo, un grupo (hetero)arilo, un grupo alquil(hetero)arilo, un grupo (hetero)arilalquilo, un grupo (hetero)cicloalquinilo se sustituye opcionalmente, dichos grupos se sustituyen de manera independiente opcionalmente con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consta de grupos alquilo C₁ - C₁₂, grupos alqueno C₂ - C₁₂, grupos alquinilo C₂ - C₁₂, grupos cicloalquilo C₃ - C₁₂, grupos alcoxi C₁ - C₁₂, grupos alquenoiloxi C₂ - C₁₂, grupos alquiniloxi C₂ - C₁₂, grupos cicloalquiloxi C₃ - C₁₂, halógenos, grupos amino, grupos oxo y grupos sililo, donde los grupos alquilo, grupos alquenoiloxi, grupos alquiniloxi, grupos cicloalquiloxi se sustituyen opcionalmente, donde los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi se interrumpen opcionalmente por uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consta de O, N y S, donde los grupos sililo se representan con la fórmula (R⁶)₃Si-, donde R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consta de grupos alquilo C₁ - C₁₂, grupos alquenoiloxi C₂ - C₁₂, grupos alquiniloxi C₂ - C₁₂, grupos cicloalquiloxi C₃ - C₁₂, grupos alcoxi C₁ - C₁₂, grupos alquenoiloxi C₂ - C₁₂, grupos alquiniloxi C₂ - C₁₂ y grupos cicloalquiloxi C₃ - C₁₂, donde los grupos alquilo, grupos alquenoiloxi, grupos alquiniloxi y grupos cicloalquiloxi se sustituyen opcionalmente, donde los grupos alquilo, los grupos alcoxi, los grupos cicloalquilo y los grupos cicloalcoxi se interrumpen opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consta de O, N y S.

[0054] Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunológico que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. El término anticuerpo se usa aquí en su sentido más amplio e incluye en concreto anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos y anticuerpos de cadena doble y simple. El término "anticuerpo" en este documento también se entiende que incluye anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos de unión específica a antígeno de cáncer. El término "anticuerpo" se entiende que incluye anticuerpos enteros, pero también fragmentos de un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab de anticuerpo, F(ab')₂, fragmento Fv o fragmento Fc de un anticuerpo escindido, un fragmento scFv-Fc, un minicuerpo, un diacuerpo o un scFv. Además, el término incluye los derivados modificados genéticamente de un anticuerpo. Anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos modificados genéticamente se pueden obtener por métodos que se conocen en la técnica. Los anticuerpos comercializados adecuados incluyen, entre otros, abcximab, rituximab, basiliximab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, alemtuzumab, adalimumab, tositumomab-1131, cetuximab, ibrituximab tiuxetan, omalizumab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, panitumumab, eculizumab, certolizumab pegol, golimumab, canakinumab, catumaxomab, ustekinumab, tocilizumab, ofatumumab, denosumab, belimumab, ipilimumab y brentuximab.

[0055] El término general "azúcar" se usa aquí para indicar un monosacárido, por ejemplo, glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man) y fucosa (Fuc). El término "derivado de azúcar" se usa aquí para indicar un derivado de un azúcar monosacárido, es decir, un azúcar monosacárido que comprende sustituyentes y/o grupos funcionales. Los ejemplos de un derivado de azúcar incluyen aminoazúcares y ácidos de azúcar, por ejemplo, glucosamina (GlcN), galactosamina (GalN) N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), ácido glucurónico (GlcA) y ácido idurónico (IdoA). Los ejemplos de un

derivado de azúcar también incluyen compuestos aquí denominados $S(A)_x$, donde S es un azúcar o un derivado de azúcar, y donde S comprende x grupos funcionales A.

[0056] Un sustituyente N-acetilglucosamina central (sustituyente GlcNAc central) se define aquí como una GlcNAc que se une mediante el C1 a un anticuerpo, preferiblemente mediante un enlace N-glicosídico al átomo de nitrógeno amídico en la cadena lateral de un aminoácido asparagina del anticuerpo. El sustituyente GlcNAc central puede estar presente en un sitio de glicosilación nativo de un anticuerpo, pero también se puede introducir en un sitio diferente en el anticuerpo. Aquí, un sustituyente N-acetilglucosamina central es un sustituyente monosacárido, o si dicho sustituyente GlcNAc central está fucosilado, un sustituyente $(Fuc\alpha 1-6)GlcNAc$ central disacárido, referido además como $GlcNAc(Fuc)$. Aquí, un "sustituyente GlcNAc central" no se debe confundir con una "GlcNAc central". Una GlcNAc central se define aquí como la GlcNAc interna que es parte de un poli o un oligosacárido que comprende más de dos sacáridos, es decir la GlcNAc mediante la cual el poli u oligosacárido se enlaza a un anticuerpo.

[0057] Un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central tal y como se define aquí es así un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc central monosacárido tal y como se ha definido anteriormente, o si dicho sustituyente GlcNAc central está fucosilado, un sustituyente $GlcNAc(Fuc)$ central disacárido.

[0058] Si un sustituyente GlcNAc central o la GlcNAc en un sustituyente $GlcNAc-S(A)_x$ está fucosilado, la fucosa más frecuentemente se enlaza en α -1,6 al C6 del sustituyente GlcNAc central. Un sustituyente GlcNAc central fucosilado se denomina $GlcNAc(Fuc)$ central, un sustituyente $GlcNAc-S(A)_x$ fucosilado se denomina $GlcNAc(Fuc)-S(A)_x$.

[0059] Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a la prevención completa o parcial de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en cuanto a una curación parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" como se usa aquí, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye prevenir que ocurra la enfermedad en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad, pero que aún no ha sido diagnosticado que la tiene; inhibiendo la enfermedad, es decir, deteniendo su desarrollo; aliviando la enfermedad, es decir, causando la regresión de la enfermedad.

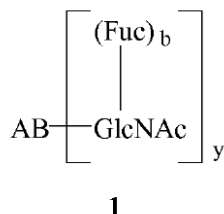
Proceso de preparación de un anticuerpo modificado

[0060] El conjugado de anticuerpo para su uso según la presente invención se puede preparar mediante un proceso que implica un paso (i) para la preparación de un anticuerpo modificado, que comprende poner en contacto un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (un sustituyente GlcNAc central) con un compuesto de fórmula $S(A)_x-P$ en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho sustituyente GlcNAc central es opcionalmente fucosilado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una galactosiltransferasa, donde $S(A)_x$ es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), y donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente $GlcNAc-S(A)_x$ unido al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente $GlcNAc-S(A)_x$.

[0061] En una forma de realización preferida, el anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (sustituyente GlcNAc central) es un anticuerpo monoclonal (mAb). Preferiblemente, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consta de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Más preferiblemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG, y de la forma más preferible dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1. Cuando dicho anticuerpo es un anticuerpo entero, el anticuerpo preferiblemente comprende uno o más, más preferiblemente uno, sustituyentes GlcNAc central en cada cadena pesada, donde dicho sustituyente GlcNAc central es opcionalmente fucosilado. Dicho anticuerpo entero comprende así preferiblemente dos o más, preferiblemente dos, sustituyentes GlcNAc central opcionalmente fucosilados. Cuando dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple o un fragmento de un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, el anticuerpo preferiblemente comprende uno o más sustituyentes GlcNAc central, que es opcionalmente fucosilado.

[0062] En el anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc central (es decir, la materia de inicio del proceso), dicho sustituyente GlcNAc central se puede situar en cualquier sitio en el anticuerpo, siempre que dicho sustituyente no obstaculice el sitio de unión del antígeno del anticuerpo. En una forma de realización, dicho sustituyente GlcNAc central se sitúa en el fragmento Fc del anticuerpo, más preferiblemente en el dominio C_H2 . En otra forma de realización, dicho sustituyente GlcNAc central se sitúa en el fragmento Fab del anticuerpo.

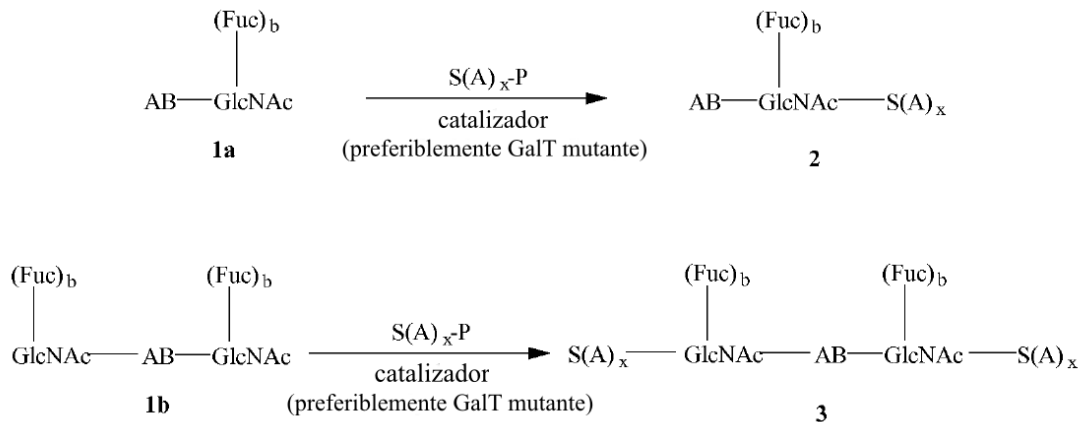
[0063] En una forma de realización, el anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc central, donde dicho sustituyente GlcNAc central es opcionalmente fucosilado, tiene la fórmula (1), donde AB representa un anticuerpo, GlcNAc es N-acetilglucosamina, Fuc es fucosa, b es 0 o 1 e y es de 1 a 20.



5 [0064] En una forma de realización preferida, y es de 1 a 10, más preferiblemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, incluso más preferiblemente y es 1, 2, 3 o 4 y de la forma más preferible y es 1 o 2.

10 [0065] Una forma de realización del paso (i) del proceso donde la materia de inicio del proceso es un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc central opcionalmente fucosilado (**1a**, y es 1) y una forma de realización donde dicha materia de inicio es un anticuerpo que comprende dos sustituyentes GlcNAc central opcionalmente fucosilados (**1b**, y es 2) se muestra en el esquema 1, donde AB representa un anticuerpo y donde b es 0 o 1. S(A)_x y P son tal y como se ha definido anteriormente.

15 [0066] La modificación del anticuerpo (**1a**) conduce a un anticuerpo modificado que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x (**2**) y la modificación de un anticuerpo (**1b**) conduce a un anticuerpo modificado que comprende dos sustituyentes GlcNAc-S(A)_x (**3**).



Esquema 1

20 [0067] Diferentes catalizadores adecuados para paso (i) del proceso se conocen en la técnica. Un catalizador adecuado para un proceso específico es un catalizador por el que el nucleótido de derivado de azúcar específico S(A)_x-P en ese proceso específico es un sustrato. Preferiblemente, el catalizador se selecciona del grupo de galactosiltransferasas, más preferiblemente del grupo de β(1,4)-galactosiltransferasas o α(1,3)-N-galactosiltransferasas, incluso más preferiblemente del grupo de β(1,4)-galactosiltransferasas o α(1,3)-N-galactosiltransferasas que comprende un dominio catalítico mutante. Un catalizador adecuado es, por ejemplo, un catalizador que comprende un dominio catalítico mutante a partir de una β(1,4)-galactosiltransferasa I. Un dominio catalítico se refiere aquí a un segmento de aminoácido que se incorpora a un dominio que es capaz de catalizar el enlazado del nucleótido de derivado de azúcar específico S(A)_x-P al sustituyente GlcNAc central en un proceso específico para preparar el conjugado de anticuerpo para su uso según la invención. Un dominio catalítico puede tener una secuencia de aminoácidos como se encuentra en una enzima de tipo salvaje, o tener una secuencia de aminoácidos que es diferente de una secuencia de tipo salvaje. Aquí se hace referencia a un dominio catalítico con una secuencia de aminoácidos que es diferente de una secuencia de tipo salvaje como un dominio catalítico mutante. La mutación puede comprender, por ejemplo, un cambio de aminoácidos único (una mutación puntual),

pero también un cambio de aminoácidos múltiple (por ejemplo, de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 6, más preferiblemente de 1, 2, 3 o 4, incluso más preferiblemente de 1 o 2 aminoácidos), o una eliminación o inserción de uno o más (por ejemplo, de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 6, más preferiblemente de 1, 2, 3 o 4, incluso más preferiblemente de 1 o 2) aminoácidos. Dicho dominio catalítico mutante puede estar presente en una enzima en toda su longitud, por ejemplo, una enzima $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa I, pero también en, por ejemplo, un fragmento de polipéptido o un polipéptido recombinante que comprende dicho dominio catalítico mutante, enlazado opcionalmente a aminoácidos adicionales.

[0068] La $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa I se denomina aquí GalT. Dichos dominios catalíticos de GalT mutante se describen, por ejemplo, en WO 2004/063344 (National Institutes of Health). WO 2004/063344 divulga mutantes Tyr-289 de GalT, que se denominan Y289L, Y289N e Y289I. El método de preparación de dichos dominios catalíticos mutantes Y289L, Y289N e Y289I se describe en detalle en WO 2004/063344, pág. 34, l. 6 - pág. 36, l. 2.

[0069] Los dominios de GalT mutantes que catalizan la formación de un enlace de glucosa- $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosamina se describen en WO 2004/063344 en la pág. 10, l. 25 - pág. 12, l. 4. Los dominios de GalT mutantes que catalizan la formación de un enlace de N-acetilgalactosamina- $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosamina se describen en WO 2004/063344 en la pág. 12, l. 6 - pág. 13, l. 2. Los dominios de GalT mutantes que catalizan la formación de un enlace de N-acetilglucosamina- $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosamina y un enlace de manosa- $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosamina se describen en WO 2004/063344 en la pág. 12, l. 19 - en la pág. 14, l. 6. Los dominios de GalT mutantes descritos se pueden incluir en las enzimas GalT de longitud total, o en moléculas recombinantes que contienen los dominios catalíticos, como se describe en WO 2004/063344 en la pág. 14, l. 31 - pág. 16, l. 28.

[0070] Otro dominio de GalT mutante es, por ejemplo, Y284L, divulgado por Bojarová *et al.*, *Glycobiology* **2009**, 19, 509. La mutación en la posición 284 se refiere a un residuo de tirosina.

[0071] Otro dominio de GalT mutante es, por ejemplo, R228K, divulgado por Qasba *et al.*, *Glycobiology* **2002**, 12, 691, donde Arg228 se reemplaza por lisina.

[0072] En una forma de realización preferida del proceso de preparación del anticuerpo modificado según, dicho catalizador es un catalizador que comprende un dominio catalítico mutante de una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, preferiblemente una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa bovina. En otra forma de realización preferida, dicho catalizador es un catalizador que comprende un dominio catalítico mutante de GalT seleccionado del grupo que consta de Y289L, Y289N, Y289I, Y284L y R228K, preferiblemente Y289L. En una forma de realización específica, el catalizador es un catalizador que comprende un dominio catalítico mutante de una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, preferiblemente seleccionado del grupo que consta de GalT Y289L, GalT Y289N y GalT Y289I, más preferiblemente GalT Y289L o GalT Y289N, y de la forma más preferible GalT Y289L.

[0073] En otra forma de realización, el catalizador es un catalizador que comprende un dominio catalítico mutante a partir de una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa bovina, seleccionada del grupo que consta de GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I y GalT Y289A, preferiblemente seleccionada del grupo que consta de GalT Y289F y GalT Y289M. GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I y GalT Y289A pueden ser previstas mediante procesos de mutagénesis dirigidos al sitio, de una manera similar a como se describe en WO 2004/063344, en Qasba *et al.*, Prot. Expr. Pur. 2003, 30, 219 y en Qasba *et al.*, J. Biol. Chem. 2002, 277, 20833 para Y289L, Y289N e Y289I. En GalT Y289F el aminoácido tirosina (Y) en la posición 289 se sustituye por un aminoácido fenilalanina (F), en GalT Y289M dicha tirosina se sustituye por un aminoácido metionina (M), en GalT Y289V por un aminoácido valina (V), en GalT Y289G por un aminoácido glicina (G), en GalT Y289I por un aminoácido isoleucina (I) y en Y289A por un aminoácido alanina (A).

[0074] Otro tipo de catalizador adecuado es un catalizador basado en $\alpha(1,3)$ -N-galactosiltransferasa (también denominado a3Gal-T), preferiblemente $\alpha(1,3)$ -N-acetilgalactosaminiltransferasa (también denominado a3GalNAc-T), como se describe en WO 2009/025646. La mutación de a3Gal-T puede ampliar la especificidad donante de la enzima, y hacerla una a3GalNAc-T. La mutación de a3GalNAc-T puede ampliar la especificidad donante de la enzima. Fragmentos de polipéptido y dominios catalíticos de $\alpha(1,3)$ -N-acetilgalactosaminiltransferasas se describen en WO 2009/025646 en p. 26, l. 18 - p. 47, l. 15 y p. 77, l. 21 - p. 82, l. 4.

[0075] En una forma de realización, el catalizador es una galactosiltransferasa de tipo salvaje, más preferiblemente una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa de tipo salvaje o una $\beta(1,3)$ -N-galactosiltransferasa de tipo salvaje, e incluso más preferiblemente una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa I de tipo salvaje. Aquí también se hace referencia a $\beta(1,4)$ -Galactosiltransferasa como GalT. Incluso más preferiblemente, la $\beta(1,4)$ -Galactosiltransferasa se selecciona del grupo que consta de una $\beta(1,4)$ -Gal-T1 bovina, una $\beta(1,4)$ -Gal-T1 humana, una $\beta(1,4)$ -Gal-T2 humana, una $\beta(1,4)$ -Gal-T3 humana y una $\beta(1,4)$ -Gal-T4 humana. Incluso más preferiblemente, la $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa es una

$\beta(1,4)$ -Gal-T1. Cuando el catalizador es una $\beta(1,3)$ -N-galactosiltransferasa de tipo salvaje, se prefiere una $\beta(1,3)$ -Gal-T5 humana.

[0076] Esta forma de realización donde el catalizador es una galactosiltransferasa de tipo salvaje es particularmente preferida cuando un grupo funcional A en el derivado de azúcar $S(A)_x$ está presente en el C2 o C6, preferiblemente el C6, de dicho derivado de azúcar. En esta forma de realización, se prefiere además que $Su(A)_x$ comprenda un grupo funcional A, es decir, x es preferiblemente 1. P, $Su(A)_x$ y $Su(A)_x$ -P se describen con más detalle a continuación.

[0077] En consecuencia, un anticuerpo modificado puede ser preparado por un proceso que comprende poner en contacto un sustituyente N-acetilglucosamina (GlcNAc) central con un compuesto de fórmula $S(A)_x$ -P en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho catalizador es una galactosiltransferasa de tipo salvaje, donde $S(A)_x$ es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y donde x es 1, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), y donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$ enlazado al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$.

[0078] El proceso de preparación de un anticuerpo modificado se realiza preferiblemente en una solución tamponada adecuada, tal como, por ejemplo, fosfato, solución salina tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con tris), citrato, HEPES, tris y glicina. Los tampones adecuados se conocen en la técnica. Preferiblemente, la solución tamponada es solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón tris.

[0079] El proceso se realiza preferiblemente en el rango de temperatura de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 °C, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 °C, incluso más preferiblemente en el rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 °C, y de la forma más preferible en el rango de aproximadamente 30 a aproximadamente 37 °C.

[0080] El proceso se realiza preferiblemente en el rango de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, preferiblemente en el rango de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. De la forma más preferible, el proceso se realiza en el rango de pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

[0081] En el proceso, se puede utilizar una mezcla de anticuerpos como el anticuerpo de inicio, donde dicha mezcla comprende anticuerpos que comprenden uno o más sustituyentes GlcNAc central y/o uno o más sustituyentes GlcNAc(Fuc) central. Por ejemplo, cuando la mezcla de anticuerpos de inicio comprende un anticuerpo entero con un sustituyente GlcNAc central opcionalmente fucosilado en cada cadena pesada, el anticuerpo entero puede comprender dos sustituyentes GlcNAc central, o dos sustituyentes GlcNAc(Fuc) central, o un sustituyente GlcNAc central y un sustituyente GlcNAc(Fuc) central.

[0082] La GlcNAc en el sustituyente GlcNAc central monosacárido está en la posición terminal, mientras que la GlcNAc en el sustituyente GlcNAc(Fuc) central disacárido está en una posición interna, enlazado al anticuerpo mediante el C1 y a la Fuc mediante el C6. Ya que, como se describió anteriormente, dichos catalizadores enzimáticos mutantes de galactosiltransferasas son también capaces de reconocer azúcares internos y derivados de azúcar como un aceptor, el derivado de azúcar $S(A)_x$ se enlaza al sustituyente GlcNAc central en el proceso, con independencia de si dicha GlcNAc está fucosilada o no. Ventajosamente, la eliminación de la fucosa antes del paso (i) del proceso no es, por lo tanto, necesaria, ya que se puede usar en el proceso una mezcla de anticuerpos que comprende sustituyentes tanto de GlcNAc central como de GlcNAc(Fuc) central. Sin embargo, si se desea, la fucosa se puede quitar de cualquier sustituyente GlcNAc(Fuc) central antes del paso (i) del proceso, por ejemplo, mediante defucosilación en presencia de α -fucosidasa como se conoce en la técnica.

[0083] $S(A)_x$ se define como un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A, donde A es un grupo azida y donde x es 1, 2, 3 o 4. Un grupo azida es un grupo funcional azida $-N_3$. El derivado de azúcar $S(A)_x$ puede comprender uno o más grupos funcionales A. En una forma de realización preferida, x es 1 o 2, más preferiblemente x es 1.

[0084] El derivado de azúcar $S(A)_x$ se deriva de un azúcar o un derivado de azúcar S, por ejemplo, un aminoazúcar o un azúcar derivado de otro modo. Los ejemplos de azúcares y derivados de azúcar incluyen galactosa (Gal), manosa (Man), glucosa (Glc), ácido glucurónico (Gcu) y fucosa (Fuc). Un aminoazúcar es un azúcar donde un grupo hidroxilo (OH) se sustituye por un grupo amino y los ejemplos incluyen N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilgalactosamina (GalNAc). Los ejemplos de un azúcar derivado de otro modo incluyen ácido glucurónico (Gcu) y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). El derivado de azúcar $S(A)_x$ se deriva preferiblemente de galactosa (Gal), manosa (Man), N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), ácido glucurónico (Gcu),

fucosa (Fuc) y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), preferiblemente del grupo que consta de GlcNAc, Glc, Gal y GalNAc. Más preferiblemente $S(A)_x$ se deriva de Gal o GalNAc, y de la forma más preferible $S(A)_x$ se deriva de GalNAc.

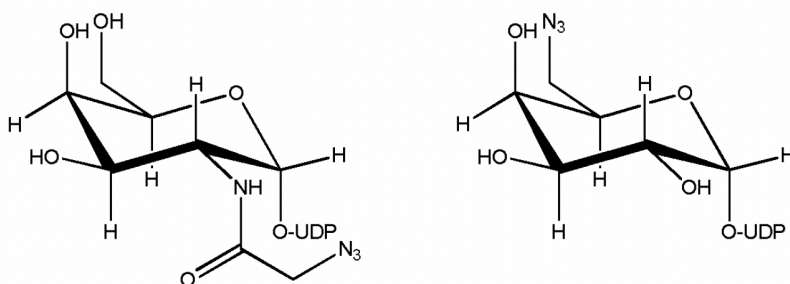
[0085] El uno o más grupos funcionales A en $S(A)_x$ se pueden enlazar al azúcar o derivado de azúcar S de diferentes maneras. El uno o más grupos funcionales A se puede enlazar al C2, C3, C4 y/o C6 del azúcar o derivado de azúcar, en vez de un grupo hidroxilo (OH). Debe observarse que, ya que la fucosa carece de un grupo OH en C6, si A se enlaza al C6 de Fuc, entonces A toma la posición de un átomo de H.

[0086] A es un grupo azida y se prefiere que A esté enlazado a C2, C4 o C6. Como se describió anteriormente, el uno o más sustituyentes de azida en $S(A)_x$ se pueden enlazar al C2, C3, C4 o C6 del azúcar o derivado de azúcar S, en vez de un grupo hidroxilo (OH) o, en caso de 6-azidofucosa (6-AzFuc), en vez de un átomo de hidrógeno. Alternativa o adicionalmente, el sustituyente N-acetilo de un derivado de aminoazúcar se puede sustituir por un sustituyente azidoacetilo. En una forma de realización preferida $S(A)_x$ se selecciona del grupo que consta de 2-azidoacetamidogalactosa (GalNAz), 6-azido-6-desoxigalactosa (6-AzGal), 6-azido-6-desoxi-2-acetamidogalactosa (6-AzGalNAc), 4-azido-4-desoxi-2-acetamidogalactosa (4-AzGalNAc), 6-azido-6-desoxi-2-azidoacetamido-galactosa (6-AzGalNAz), 2-azidoacetamidoglucosa (GlcNAz), 6-azido-6-desoxiglucosa (6-AzGlc), 6-azido-6-desoxi-2-acetamidoglucosa (6-AzGlcNAc), 4-azido-4-desoxi-2-acetamidoglucosa (4-AzGlcNAc) y 6-azido-6-desoxi-2-azidoacetamidoglucosa (6-AzGlcNAz), más preferiblemente del grupo que consta de GalNAz, 4-AzGalNAc, GlcNAz y 6-AzGlcNAc. Los ejemplos de $S(A)_x$ -P donde A es un grupo azida se muestran a continuación.

[0087] Los compuestos de fórmula $S(A)_x$ -P, donde un monofosfato de nucleósido o un difosfato de nucleósido P se enlaza a un derivado de azúcar $S(A)_x$, se conocen en la técnica. Por ejemplo, Wang *et al.*, Chem. Eur. J. 2010, 16, 13343-13345, Piller *et al.*, ACS Chem. Biol. 2012, 7, 753, Piller *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15, 5459-5462 y WO 2009/102820, revelan una serie de compuestos $S(A)_x$ -P y sus síntesis.

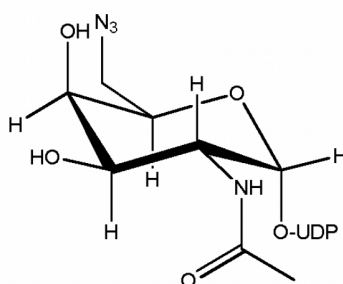
[0088] En una forma de realización preferida, el mono o difosfato de nucleósido P en $S(A)_x$ -P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP), difosfato de timidina (TDP), difosfato de citidina (CDP) y monofosfato de citidina (CMP), preferiblemente UDP.

[0089] Diferentes ejemplos (5 - 7) de difosfatos de uridina enlazados a azúcares sustituidos con azida y derivados de azúcar, $S(A)_x$ -UDP, se muestran a continuación.



5

6



7

[0090] Preferiblemente, $S(A)_x$ -P se selecciona del grupo que consta de GalNAz-UDP (5), 6-AzGal-UDP (6), 6-AzGalNAc-UDP (7), 4-AzGalNAz-UDP, 6-AzGalNAz-UDP, 6-AzGlc-UDP y 6-AzGlcNAz-UDP.

[0091] De la forma más preferible, $S(A)_x$ -P es GalNAz-UDP (5) o 4-AzGalNAc-UDP (7). La síntesis de GalNAz-UDP (5) y 6-AzGalNAc-UDP (7) se describe en Piller *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15, 5459-5462 y Wang *et al.*, Chem. Eur. J. 2010, 16, 13343-13345.

[0092] Como se describió anteriormente, en el proceso para la modificación de un anticuerpo, $S(A)_x$ -P puede ser cualquier nucleótido de derivado de azúcar que es un sustrato para un catalizador de galactosiltransferasa adecuado.

[0093] Una forma de realización preferida del proceso se muestra en la figura 4. La figura 4 muestra un anticuerpo monoclonal (mAb) que comprende un sustituyente GlcNAc central, opcionalmente fucosilado ($b = 0$ o 1), en cada cadena pesada del anticuerpo. Estos sustituyentes GlcNAc central ($b = 0$) y GlcNAc(Fuc) central ($b = 1$) se convierten en sustituyentes GlcNAc-GalNAz y GlcNAc(Fuc)-GalNAz, respectivamente. Dicha conversión se ejecuta mediante reacción con GalNAz-UDP (5) en presencia de una enzima GalT Y289L mutante como un catalizador.

[0094] El paso (i) del proceso se refiere generalmente a la preparación de un anticuerpo modificado, donde el proceso comprende:

(a) proporcionar un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (sustituyente GlcNAc central), opcionalmente fucosilado, seguido de

(b) poner en contacto dicho anticuerpo con un compuesto de fórmula $S(A)_x$ -P en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una galactosiltransferasa, donde $S(A)_x$ es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), y donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$ enlazado al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$.

[0095] El anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc central opcionalmente fucosilado puede ser proporcionado de varias maneras. Dichos anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos modificados genéticamente, etc. pueden ser proporcionados por métodos que son conocidos para el experto en la técnica. Por ejemplo, fragmentos Fab o Fc se pueden preparar por digestión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intacta con papaína, o por expresión recombinante de las partes deseadas de una cadena pesada y ligera de inmunoglobulina.

[0096] En una forma de realización, el proceso comprende, además, la desglicosilación de un glicano de un anticuerpo que tiene una N-acetilglucosamina central, en presencia de una endoglicosidasa, para obtener un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central, donde dicha N-acetilglucosamina central y dicho sustituyente N-acetilglucosamina central son opcionalmente fucosilados. Dependiendo de la naturaleza del glicano, se puede seleccionar una endoglicosidasa adecuada. La endoglicosidasa se selecciona preferiblemente del grupo que consta de enzimas Endo S, Endo A, Endo F, Endo M, Endo D y Endo H y/o una combinación de las mismas, la selección de la cual depende de la naturaleza del glicano. En otra forma de realización preferida, la endoglicosidasa es Endo S, Endo S49, Endo F o una combinación de las mismas. En otra forma de realización preferida, la endoglicosidasa es Endo S, Endo F o una combinación de las mismas. En otra forma de realización preferida, la endoglicosidasa es Endo S. En otra forma de realización preferida la endoglicosidasa es Endo S49.

[0097] Un glicano de un anticuerpo que tiene una N-acetilglucosamina central se define aquí como un anticuerpo que comprende un glicano que se une al anticuerpo mediante el C1 de una GlcNAc (la GlcNAc central) opcionalmente fucosilada. Además de dicha GlcNAc central y la Fuc opcional, dicho glicano comprende al menos un azúcar o derivado de azúcar más.

[0098] Una forma de realización preferida de dicho paso de desglicosilación del proceso se muestra en la figura 5, donde una mezcla de glicoformas de anticuerpo G2F, G1F, G0F, G2, G1 y G0, y posiblemente más glicoformas tales como glicanos triantennarios, se convierte en anticuerpos que comprenden un sustituyente N-acetilglucosamina central opcionalmente fucosilado (b es 0 o 1). Las glicoformas G2F, G1F, G0F, G2, G1 y G0 se muestran en la figura 1.

[0099] Por lo tanto, el paso (i) del proceso también se refiere a un proceso de preparación de un anticuerpo modificado, donde el proceso comprende:

(a) desglicosilación de un glicano de un anticuerpo con una N-acetilglucosamina central, en presencia de una endoglicosidasa, para obtener un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central es opcionalmente fucosilado, seguido de
(b) poner en contacto dicho anticuerpo con un compuesto de fórmula $S(A)_x$ -P en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una galactosiltransferasa, donde $S(A)_x$ es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), y donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$ enlazado al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$.

[0100] El paso (i) del proceso también se refiere a un proceso de preparación de un anticuerpo modificado, donde el proceso comprende:

(a) desglicosilación de un glicano de un anticuerpo con una N-acetilglucosamina central, en presencia de una endoglicosidasa, para obtener un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central es opcionalmente fucosilado, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central se enlaza mediante un enlace N-glicosídico al átomo de nitrógeno amídico en la cadena lateral de un aminoácido asparagina del anticuerpo, y donde dicha endoglicosidasa es Endo S, Endo S49, Endo F, o una combinación de las mismas; seguido de

(b) poner en contacto dicho anticuerpo con un compuesto de fórmula $S(A)_x$ -P en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una galactosiltransferasa, donde $S(A)_x$ es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP), y difosfato de citidina (CDP),

donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$ enlazado al anticuerpo a través de C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$.

[0101] En una forma de realización preferida, dicha endoglicosidasa se selecciona del grupo que consta de Endo S, Endo F, o una combinación de las mismas. En otra forma de realización preferida, la endoglicosidasa es Endo S, Endo F o una combinación de las mismas. En una forma de realización más preferida, dicha endoglicosidasa es Endo S. En otra forma de realización preferida, dicha endoglicosidasa es Endo S49. En otra forma de realización preferida, dicha endoglicosidasa se selecciona del grupo que consta de Endo S, Endo S49, Endo F y/o una combinación de las mismas. Más preferiblemente, dicha endoglicosidasa es Endo S o Endo S49. De la forma más preferible, dicha endoglicosidasa es Endo S o Endo F.

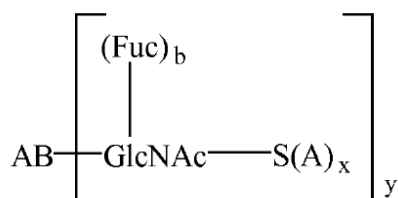
[0102] Endo S, Endo A, Endo F, Endo M, Endo D y Endo H son conocidas para el experto en la técnica. Endo S49 se describe en WO 2013/037824 (Genovis AB). Endo S49 se aísla de *Streptococcus pyogenes* NZ131 y es un homólogo de Endo S. Endo S49 tiene una actividad de endoglicosidasa específica en IgG nativo y escinde una variedad mayor de glicanos Fc que Endo S. En una forma de realización preferida, dicha N-acetilglucosamina central está presente en un sitio de N-glicosilación nativo del anticuerpo. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo es IgG y dicha N-acetilglucosamina central está presente en un sitio de N-glicosilación nativo del IgG. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo es IgG, dicha N-acetilglucosamina central está presente en un sitio de N-glicosilación nativo del IgG, y el sitio nativo es el sitio de N-glicosilación N297 del IgG. El sitio de N-glicosilación N297 está presente en la región Fc de la cadena pesada de un anticuerpo IgG.

[0103] Cuando dicha N-acetilglucosamina central está presente en un sitio de N-glicosilación nativo de un anticuerpo IgG, se prefiere que la endoglicosidasa se seleccione del grupo que consta de Endo S, Endo S49 y Endo F, y una combinación de las mismas. Más preferiblemente, la endoglicosidasa es Endo S, Endo S49 o Endo F, incluso más preferiblemente Endo S o Endo F, y de la forma más preferible Endo S. Como se conoce en la técnica, Endo H, Endo M, Endo F1 son menos adecuadas para la desglicosilación de un glicano que está presente en el sitio nativo de un anticuerpo IgG. En particular, son menos adecuadas para la desglicosilación de un glicano que está presente en N297.

Anticuerpo modificado

[0104] El proceso de preparación de un anticuerpo modificado produce un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x, donde GlcNAc es una N-acetilglucosamina, donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x se enlaza al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x, y donde dicha N-acetilglucosamina es opcionalmente fucosilada. A tal anticuerpo se hace referencia aquí como un anticuerpo modificado.

[0105] En una forma de realización, el anticuerpo modificado tiene la fórmula (4), donde AB representa un anticuerpo, GlcNAc es N-acetilglucosamina, Fuc es fucosa, b es 0 o 1 e y es 1 a 20, y donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4. En una forma de realización preferida, y es de 1 a 10, más preferiblemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, incluso más preferiblemente y es 1, 2, 3 o 4 y de la forma más preferible y es 1 o 2.



4

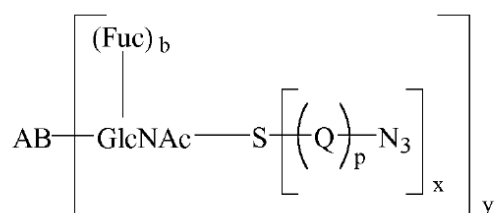
[0106] El derivado de azúcar S(A)_x en el sustituyente GlcNAc-S(A)_x del anticuerpo modificado puede unirse, por ejemplo, al C4 del GlcNAc mediante un enlace β(1,4)-glicosídico o al C3 de dicha GlcNAc mediante un enlace α(1,3)-glicosídico. La N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x se enlaza mediante el C1 al anticuerpo, preferiblemente mediante un enlace N-glicosídico al átomo de nitrógeno amídico en la cadena lateral de un aminoácido asparagina del anticuerpo (GlcNAcβ1-Asn). La GlcNAc en dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x es opcionalmente fucosilada. Si el derivado de azúcar S(A)_x en el sustituyente GlcNAc-S(A)_x del anticuerpo modificado se enlaza al C4 de la GlcNAc mediante un enlace β(1,4)-glicosídico o al C3 de dicha GlcNAc mediante un enlace α(1,3)-glicosídico depende del catalizador que se usó en el proceso de preparación del anticuerpo modificado. Cuando el proceso se realiza en presencia de un catalizador de β(1,4)-galactosiltransferasa, entonces ocurre la unión mediante el C1 del S(A)_x y el C4 de la GlcNAc mediante un enlace β(1,4)-glicosídico. Cuando el proceso se realiza en la presencia de un catalizador de α(1,3)-galactosiltransferasa, entonces la unión ocurre mediante el C1 del S(A)_x y el C3 de la GlcNAc mediante un enlace α(1,3)-glicosídico.

[0107] A es un grupo funcional azida y el anticuerpo modificado se denomina anticuerpo modificado con azida. El anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida.

[0108] En una forma de realización preferida, dicho S(A)_x se deriva de un azúcar o derivado de azúcar seleccionado del grupo que consta de galactosa (Gal), manosa (Man), N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), ácido glucurónico (Gcu), fucosa (Fuc) y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), preferiblemente Gal, GlcNAc, glucosa y GalNAc.

[0109] En otra forma de realización preferida S(A)_x se selecciona del grupo que consta de GalNAz, 6-AzGal, 6-AzGalNAc, 4-AzGalNAz, 6-AzGalNAz, 6-AzGlc y 6-AzGlcNAz. De la forma más preferible, S(A)_x es GalNAz o 4-AzGalNAc.

[0110] Un anticuerpo modificado con azida puede tener la estructura que se muestra a continuación, donde S(A)_x, donde A es azida, se representa como S[(Q)_p-N₃]_x:



donde:

b es 0 o 1;
 x es 1, 2, 3 o 4;
 S es un derivado de azúcar;
 p es 0 o 1;
 Q es -N(H)C(O)CH₂- o -CH₂-;
 y es 1 - 20;

y donde AB es un anticuerpo, S es un azúcar o un derivado de azúcar, GlcNAc es N-acetilglucosamina. GlcNAc es opcionalmente fucosilada (b es 0 o 1).

[0111] El anticuerpo modificado con azida puede comprender de 1 a 20 sustituyentes opcionalmente fucosilados GlcNAc-S(A)_x (y es de 1 a 20). Preferiblemente, y es de 1 a 10, más preferiblemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, incluso más preferiblemente y es 1, 2, 3 o 4 y de la forma más preferible y es 1 o 2.

[0112] El valor de p y la naturaleza de Q dependen del derivado de azúcar sustituido con azida S(A)_x que está presente en el anticuerpo modificado con azida. Si un grupo azida en S(A)_x está presente en la posición C2, C3, o C4 del azúcar o el derivado de azúcar, es decir en vez del grupo OH del azúcar, entonces p es 0. Si un grupo azida en S(A)_x es un grupo 2-azidoacetamido, es decir, S(A)_x es por ejemplo GalNAz o GlcNAz, entonces p es 1 y Q es -N(H)C(O)CH₂-. Si un grupo azida en S(A)_x está presente en la posición C6 del azúcar o el derivado de azúcar, es decir, en vez de un grupo OH del azúcar o en caso de 6-AzFuc en vez de un átomo de H, entonces p es 1 y Q es -CH₂-.

[0113] Preferiblemente el anticuerpo modificado es un anticuerpo monoclonal, más preferiblemente seleccionado del grupo que consta de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Incluso más preferiblemente dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG, y de la forma más preferible dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1. Cuando el anticuerpo modificado es un anticuerpo entero, el anticuerpo preferiblemente comprende dos o más, más preferiblemente dos, sustituyentes GlcNAc-S(A)_x, donde dichos sustituyentes GlcNAc-S(A)_x son opcionalmente fucosilados. Sin embargo, si el anticuerpo modificado es un fragmento de un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab o Fc, el anticuerpo puede tener solo un sustituyente GlcNAc-S(A)_x, que es opcionalmente fucosilado.

[0114] En el anticuerpo modificado, el sustituyente GlcNAc-S(A)_x se puede situar en cualquier sitio en el anticuerpo, siempre que dicho sustituyente no obstaculice la unión de un antígeno al sitio de unión del antígeno del anticuerpo. En una forma de realización, dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x se sitúa en el dominio Fc del anticuerpo, más preferiblemente en el dominio C_H2. En otra forma de realización, dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x se sitúa en el dominio Fab del anticuerpo. En otra forma de realización, dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x se sitúa en un fragmento Fab o Fc del anticuerpo.

[0115] Como se describió, el proceso de preparación del anticuerpo modificado puede proporcionar anticuerpos modificados que comprenden más de un sustituyente GlcNAc-S(A)_x. El número de sustituyentes en los anticuerpos depende no solo de la naturaleza del anticuerpo que se va a modificar (por ejemplo, anticuerpo entero, cadena simple, fragmento, etc.), sino también del número de sustituyentes GlcNAc central que están presentes en el anticuerpo que se va a modificar.

Proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo

[0116] El anticuerpo modificado se puede usar en la preparación de un conjugado de anticuerpo (AC). Un conjugado de anticuerpo (AC) se define aquí como un anticuerpo que se conjuga a una molécula de interés (D) mediante un enlazador (L). El conjugado de anticuerpo para su uso según la invención se puede conjugar a una o a más de una molécula de interés (D) mediante dicho enlazador (L).

[0117] La molécula de interés es una sustancia activa. Una sustancia activa es una sustancia farmacológica, es decir, una sustancia que es farmacéuticamente activa. La sustancia activa es una citotoxina. Los ejemplos de citotoxinas incluyen camptotecinas, staurosporina, doxorubicina, daunorrubicina, colchicina, metotrexato, taxanos, calicheamicinas, duocarmicinas, maitansinas y maitansinoides (es decir, derivados de maitansina), auristatinas, tubulisina M, criptoficina o pirrolobenzodiazepinas (PBD). Los ejemplos de auristatinas incluyen dolastatina 10, auristatina F, monometil auristatina F (MMAF), auristatina E, monometil auristatina E (MMAE), auristatina PE, auristatina TP y auristatina AQ. Los ejemplos de maitansinas y maitansinoides incluyen mertansina y ansamitocina.

[0118] En el conjugado de anticuerpo (AC) para su uso según la invención, la molécula de interés se conjuga al anticuerpo mediante un enlazador (L). Los enlazadores o unidades de conexión se conocen bien en la técnica, y se describen con más detalle a continuación.

[0119] El conjugado de anticuerpo para su uso según la invención se puede preparar mediante un proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo, que comprende hacer reaccionar el anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho conjugado de enlazador comprende un grupo funcional B y una o más moléculas de interés, donde dicho grupo funcional B es un grupo funcional que es capaz de reaccionar con un grupo funcional A de un sustituyente GlcNAc-S(A)_x en dicho anticuerpo modificado. Dicho conjugado de enlazador es preferiblemente de la fórmula B-L(D)_r, donde B, L y D son tal y como se ha definido anteriormente, y r es 1 - 20, preferiblemente r es 1 - 10, más preferiblemente r es 1 - 8, incluso más preferiblemente r es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, incluso más preferiblemente r es 1, 2, 3 o 4 y de la forma más preferible r es 1 o 2.

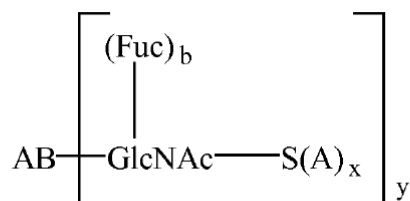
[0120] A es un grupo azida y el enlace del anticuerpo modificado con azida y el conjugado de enlazador tiene lugar preferiblemente mediante una reacción de cicloadición. El grupo funcional B es un grupo (hetero)cicloalquinilo.

[0121] En dicho proceso, una azida del anticuerpo modificado con azida reacciona con un grupo (hetero)cicloalquinilo del conjugado de enlazador a través de una reacción de cicloadición. Esta reacción de cicloadición de una molécula que comprende una azida con una molécula que comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo es una de las reacciones que se conoce en la técnica como "química click". El conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo, preferiblemente un grupo (hetero)cicloalquinilo tenso. Cuando el (hetero)cicloalquinilo es un grupo (hetero)cicloalquinilo deformado, no es necesaria la presencia de un catalizador, e incluso dicha reacción puede ocurrir espontáneamente por una reacción denominada cicloadición de azida-alquino promovida por deformación (SPAAC). Esta es una de las reacciones conocidas en la técnica como "química click libre de metales". Los grupos (hetero) cicloalquinilo tensos son conocidos en la técnica y se describen con más detalle a continuación.

[0122] Por lo tanto, el proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo comprende hacer reaccionar un anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo y una o más moléculas de interés, donde dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x, donde GlcNAc es una N-acetilglucosamina, donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x se enlaza al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x, y donde dicha GlcNAc es opcionalmente fucosilada. En otra forma de realización preferida, dicho grupo (hetero)cicloalquinilo es un grupo (hetero)cicloalquinilo tensionado.

[0123] En otra forma de realización preferida, dicho proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo comprende los pasos de:

(i) poner en contacto un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (GlcNAc) con un compuesto de fórmula S(A)_x-P en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central es opcionalmente fucosilado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una galactosiltransferasa, donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), para obtener un anticuerpo modificado, donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x unido al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x, y donde dicho anticuerpo modificado está según la fórmula (4):



4

donde:

S(A)_x y x son tal y como se ha definido anteriormente; AB representa un anticuerpo; GlcNAc es N-acetilglucosamina; Fuc es fucosa; b es 0 o 1; e y es de 1 a 20; y

(ii) hacer reaccionar dicho anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo y una o más moléculas de interés.

[0124] Una ventaja de esta forma de realización del proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo es que la presencia de un catalizador de cobre no es necesaria. Dicho proceso sucede así en ausencia de un catalizador de cobre. La presencia de un catalizador de cobre en dicho proceso tiene diferentes desventajas, sin embargo. Generalmente, el procedimiento más conveniente para la conjugación de azida a alquinos terminales requiere la presencia de Cu(I). Cobre(I) se genera típicamente in situ a partir de Cu(II), que requiere la adición de un agente reductor apropiado, por ejemplo DTT, ascorbato sódico o hidracina y la adición de un ligando adecuado para mantener el cobre en el estado de oxidación Cu(I). Sin embargo, se puede requerir optimización extensa y ajuste de condiciones para encontrar los parámetros óptimos para la conversión eficaz. No obstante, incluso bajo tales condiciones, la formación concomitante de especies reactivas de oxígeno no puede evitarse siempre completamente, lo que a su vez puede inducir daño oxidativo a la proteína, por ejemplo, oxidación de enlaces de metionina, histidina, cisteína o disulfuro. Otros protocolos han empleado fuentes de cobre(I) tales como CuBr para células fijadas de etiquetado y glicoproteínas de sintetización. En estos casos, la inestabilidad del CuI en el aire impone un requisito para grandes excesos de Cu (mayores que 4 mm) y ligando para reacciones eficaces, lo que también suscita preocupación por el daño o precipitación de proteínas, más la presencia de metal residual después de la purificación. Se ha observado que la conjugación de anticuerpos que contienen azida a alquinos terminales en presencia de cobre conduce a la formación de producto secundario extenso por la oxidación de aminoácidos no deseada. Por ejemplo, el análisis de espectros de masas de alta resolución de la cadena ligera (LC) de trastuzumab después de la conjugación catalizada con cobre indica la formación de > 20 % de especies con pesos moleculares +16/+18 (véase la figura 31). El análisis detallado de fragmentos de péptido de la cadena pesada (HC) de trastuzumab después de la digestión triptica indica la oxidación de al menos una histidina particular de hasta el 69 %, como se ejemplifica en el ejemplo 39. El análisis detallado de fragmentos de péptido de cadena ligera (LC) de trastuzumab después de la digestión triptica indica la oxidación de al menos una metionina particular, también ejemplificado en el ejemplo 39.

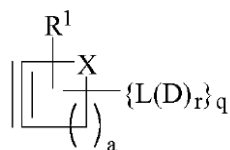
[0125] Las moléculas de interés se han descrito con más detalle anteriormente. La molécula de interés es una sustancia activa. La molécula de interés es un grupo (hetero)cicloalquinilo y se prefiere que dicha fracción sea una fracción de (hetero)ciclooctino. Las estructuras preferidas de grupos (hetero)ciclooctino se describen con más detalle a continuación.

[0126] El proceso de preparación de un anticuerpo modificado se realiza preferiblemente a una temperatura en el rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 °C, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 °C, incluso más preferiblemente en el rango de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 °C, y de la forma más preferible en el rango de aproximadamente 32 a aproximadamente 37 °C.

[0127] El proceso se realiza preferiblemente con un pH en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, preferiblemente en el rango de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. De la forma más preferible, el proceso se realiza con un pH en el rango de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

[0128] El proceso se realiza preferiblemente en agua. Más preferiblemente, dicha agua es agua purificada, incluso más preferiblemente agua ultrapura o agua de tipo I tal y como se define según ISO 3696. Agua adecuada es por ejemplo agua de milliQ®. Dicha agua es preferiblemente tamponada, por ejemplo, con solución salina tamponada con fosfato o tris. Los tampones adecuados son conocidos para un experto en la técnica. En una forma de realización preferida, el proceso se realiza en agua de milliQ que se tampona con solución salina tamponada con fosfato o tris.

[0129] En una forma de realización preferida dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (11):



11

donde:

L es un enlazador;

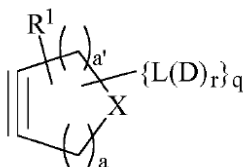
D es una molécula de interés;

r es 1 - 20;

R¹ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, -OR⁵, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁵, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo y donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen opcionalmente, donde dos sustituyentes R¹ se pueden enlazar juntos para formar un cicloalquilo anillado o un sustituyente (hetero)areno anillado, y donde R⁵ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo;

X es C(R¹)₂, O, S o NR², donde R² es R¹ o L(D)_r, y donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente; q es 0 o 1, con la condición de que si q es 0 entonces X es N-L(D)_r; y a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8.

[0130] En otra forma de realización preferida dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (11b):



11b

donde:

L es un enlazador;

D es una molécula de interés;

r es 1 - 20;

R¹ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, -OR⁵, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁵, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄ y donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen opcionalmente, donde dos sustituyentes R¹ se pueden enlazar juntos para formar un cicloalquilo anillado o un sustituyente (hetero)areno anillado, y donde R⁵ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄;

X es C(R¹)₂, O, S o NR², donde R² es R¹ o L(D)_r, y donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente; q es 0 o 1, con la condición de que si q es 0 entonces X es N-L(D)_r;

a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;

a' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8; y

a + a' < 10.

[0131] En otra forma de realización preferida, a + a' es 4, 5, 6 o 7, más preferiblemente a + a' es 4, 5 o 6 y de la forma más preferible a + a' es 5.

[0132] En una forma de realización preferida, si q es 1 entonces X es C(R¹)₂, O, S o NR¹.

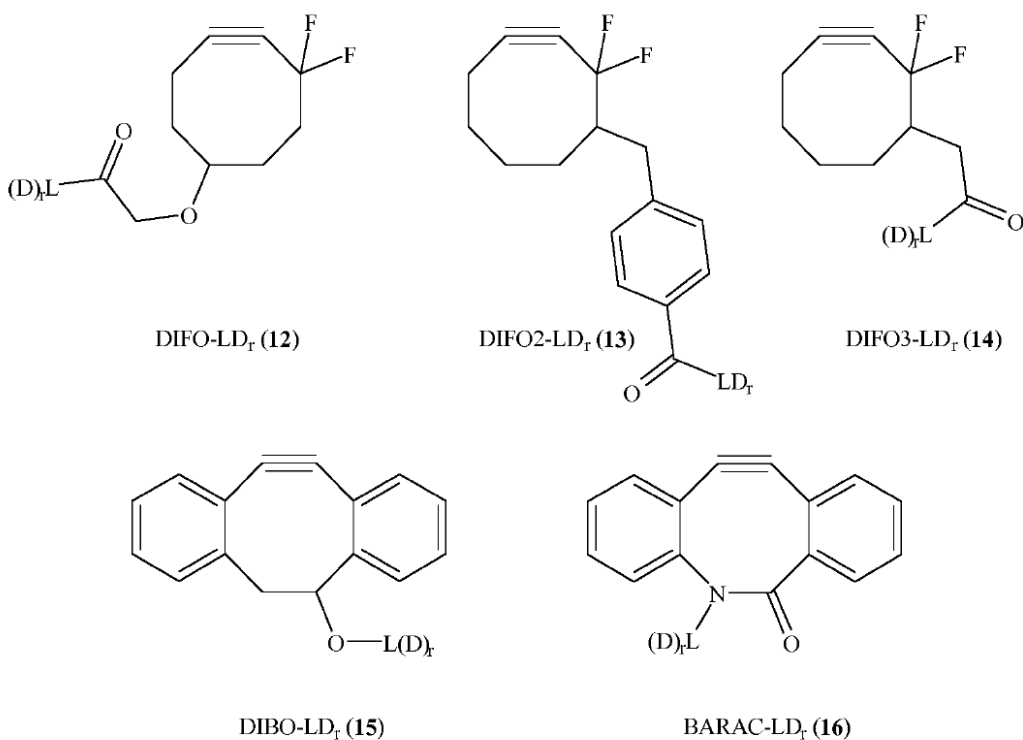
[0133] En otra forma de realización preferida, a es 5, es decir, dicho grupo (hetero)cicloalquinilo es preferiblemente un grupo (hetero)ciclooctino. En otra forma de realización preferida, X es C(R²)₂ o NR². Cuando X es C(R²)₂ se prefiere que R² sea hidrógeno. Cuando X es NR², se prefiere que R² sea L(D)_r. En otra forma de realización preferida, r es de 1 a 10, más preferiblemente, r es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, más preferiblemente r es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, de la forma más preferible r es 1, 2, 3 o 4.

[0134] El sustituyente L(D)_r puede estar presente en un átomo de C en dicho grupo (hetero)cicloalquinilo, o, en caso de un grupo heterocicloalquinilo, en el heteroátomo de dicho grupo heterocicloalquinilo. Cuando el grupo (hetero)cicloalquinilo comprende sustituyentes, por ejemplo, un cicloalquilo anillado, el sustituyente L(D)_r también puede estar presente en dichos sustituyentes.

[0135] Los métodos para conectar un enlazador L a un grupo (hetero)cicloalquinilo en el un extremo y a una molécula de interés en el otro extremo, para obtener un conjugado de enlazador, dependen de la naturaleza exacta del enlazador, el grupo (hetero)cicloalquinilo y la molécula de interés. Métodos adecuados se conocen en la técnica.

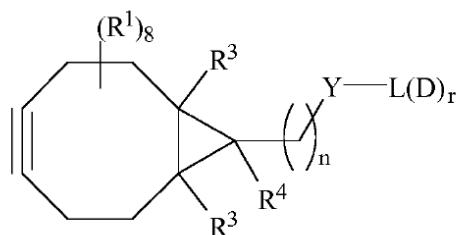
5 [0136] Preferiblemente, el conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)ciclooctino, más preferiblemente un grupo (hetero)ciclooctino tensionado. Las fracciones de (hetero)cicloalquinilo adecuado se conocen en la técnica. Por ejemplo, DIFO, DIFO2 y DIFO 3 se describen en US 2009/0068738. DIBO se describe en WO 2009/067663. DIBO puede opcionalmente ser sulfatado (S-DIBO) como se describe en J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 5381. BARAC se describe en J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 3688 - 3690 y US 2011/0207147.

10 [0137] Ejemplos preferidos de conjugados de enlazador que comprenden un grupo (hetero)ciclooctino se muestran a continuación.



15 [0138] Otras fracciones de ciclooctino que se conocen en la técnica son DIBAC (también conocidas como ADIBO o DBCO) y BCN. DIBAC se describe en Chem. Commun. 2010, 46, 97 - 99. BCN se describe en WO 2011/136645.

[0139] En una forma de realización preferida, dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (12), (13), (14), (15) o (16). En otra forma de realización preferida, dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (17):



17

donde:

R^1 , L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente;

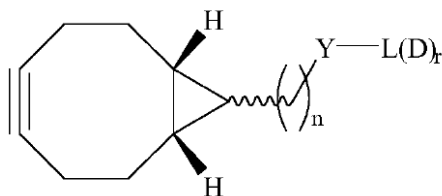
Y es O, S o NR^2 , donde R^2 es tal y como se ha definido anteriormente;

R^3 se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$;

R^4 se selecciona del grupo que consta de hidrógeno, $Y-L(D)_r$, $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$, donde los grupos alquilo se interrumpen opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consta de O, N y S, donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen de manera independiente opcionalmente; y

n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

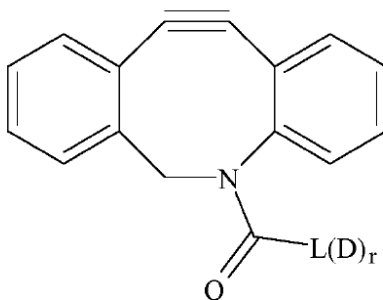
[0140] En otra forma de realización preferida, R^1 es hidrógeno. En otra forma de realización preferida, R^3 es hidrógeno. En otra forma de realización preferida, n es 1 o 2. En otra forma de realización preferida, R^4 es hidrógeno, $Y-L(D)_r$ o $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$. En otra forma de realización preferida, R^2 es hidrógeno o $L(D)_r$. En otra forma de realización preferida, el conjugado de enlazador tiene la fórmula **18**:



BCN- $L(D)_r$ **18**

donde Y, L, D, n y r son tal y como se ha definido anteriormente.

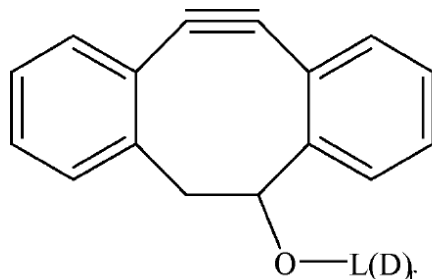
[0141] En otra forma de realización preferida, dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (**19**):



19

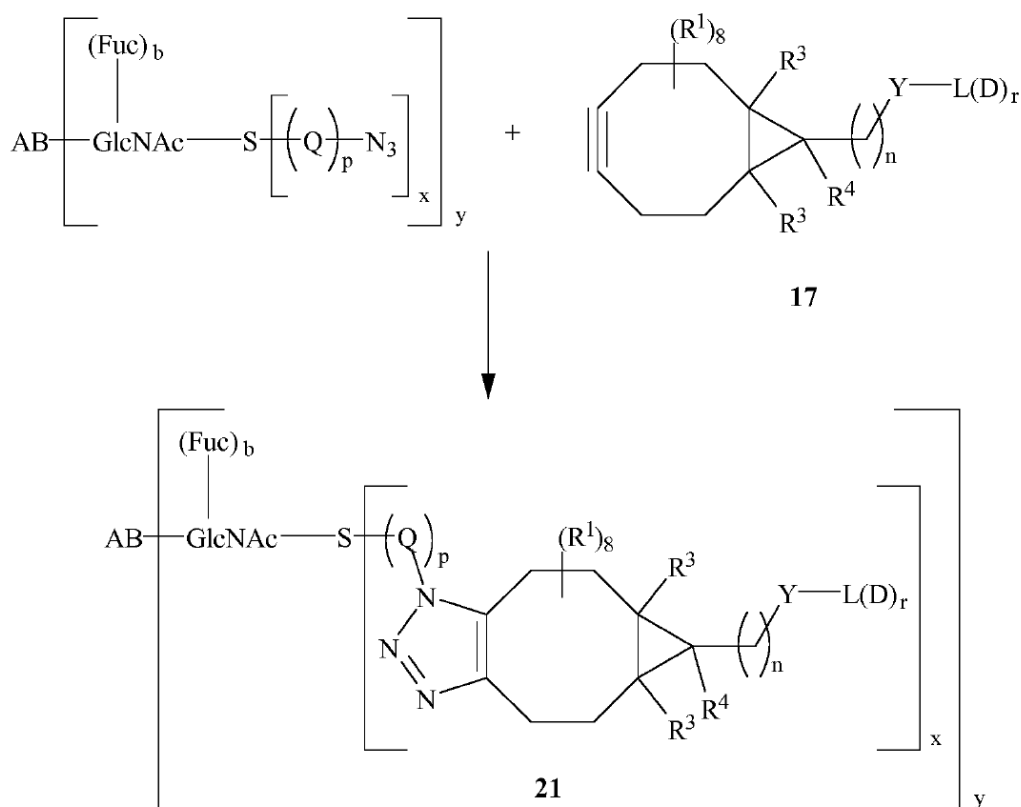
donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente.

[0142] En otra forma de realización preferida, dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (**15**):

**15**

donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente.

5 [0143] La reacción de cicloadición de un anticuerpo modificado con azida con un conjugado de enlazador que comprende un tipo preferido del grupo ciclooctino BCN-L(D)_r (17) se muestra en el esquema 2.

*Esquema 2*

donde R¹, R³, R⁴, S, Q, Y, L, D, b, p, x, n son tal y como se ha definido anteriormente, e y es 1 - 20.

10 [0144] El valor de p y la naturaleza de Q dependen del azúcar o derivado de azúcar S(A)_x sustituido con azida que está presente en el anticuerpo modificado con azida que se enlaza a un conjugado de enlazador. Si una azida en S(A)_x está presente en la posición C2, C3 o C4 del azúcar o el derivado de azúcar (en vez de un grupo OH de azúcar), entonces p es 0. Si S(A)_x es un derivado de azúcar azidoacetamido, S(A)_x es por ejemplo GalNAz o GlcNAz, entonces p es 1 y Q es -N(H)C(O)CH₂-. Si la azida en S(A)_x está presente en la posición C6 del azúcar o el derivado de azúcar, entonces p es 1 y Q es -CH₂-.

[0145] Los enlazadores (L), también denominados unidades de conexión, son bien conocidos en la técnica. En un conjugado de enlazador como se describe en este caso, L se enlaza a una molécula de interés, así como a un grupo funcional B, como se describió anteriormente.

[0146] Un conjugado de enlazador adecuado para la preparación de un anticuerpo modificado con azida es un conjugado de enlazador que comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo y una molécula de interés. Se conocen en la técnica numerosos métodos para enlazar dicho grupo (hetero)cicloalquinilo y dicha molécula de interés a L. Como estará claro para un experto en la técnica, la elección de un método adecuado para enlazar un grupo (hetero)cicloalquinilo a un extremo de un enlazador y una molécula de interés al otro extremo depende de la naturaleza exacta del grupo (hetero)cicloalquinilo, el enlazador y la molécula de interés.

[0147] Un enlazador puede tener la estructura general $F^1-L(F^2)_r$, donde F^1 representa un grupo funcional que es capaz de reaccionar con un grupo funcional F en el grupo funcional B como se ha descrito anteriormente, que es un grupo (hetero)cicloalquinilo. F^2 representa un grupo funcional que es capaz de reaccionar con un grupo funcional F en la molécula de interés.

[0148] Dado que se pueden enlazar más de una molécula de interés a un enlazador, más de un grupo funcional F^2 pueden estar presentes en L. Como se describió anteriormente, r es de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 8, incluso más preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6, incluso más preferiblemente 1, 2, 3 o 4 y de la forma más preferible, r es 1 o 2.

[0149] L puede por ejemplo seleccionarse del grupo que consta de grupos alquilenos C_1-C_{200} lineales o ramificados, grupos alquilenos C_2-C_{200} , grupos alquilenos C_2-C_{200} , grupos cicloalquilenos C_3-C_{200} , grupos cicloalquilenos C_5-C_{200} , grupos cicloalquilenos C_8-C_{200} , grupos alquilarilenos C_7-C_{200} , grupos arilalquilenos C_7-C_{200} , grupos arilalquilenos C_8-C_{200} , grupos arilalquilenos C_9-C_{200} . Opcionalmente los grupos alquilenos, grupos alquilenos, grupos alquilenos, grupos cicloalquilenos, grupos cicloalquilenos, grupos cicloalquilenos, grupos alquilarilenos, grupos arilalquilenos, grupos arilalquilenos y grupos arilalquilenos se pueden sustituir, y opcionalmente dichos grupos se pueden interrumpir con uno o más heteroátomos, preferiblemente de 1 a 100 heteroátomos, donde dichos heteroátomos se seleccionan preferiblemente del grupo que consta de O, S y NR^5 , donde R^5 se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$. De la forma más preferible, el heteroátomo es O.

[0150] F , F^1 y F^2 se pueden por ejemplo seleccionar independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, R^5 , grupos (hetero)cicloalquino $C_4 - C_{10}$, $-CH=C(R^5)_2$, $-C\equiv CR^5$, $-[C(R^5)_2C(R^5)_2O]_q-R^5$, donde q está en el rango de 1 a 200, $-CN$, $-N_3$, $-NCX$, $-XCN$, $-XR^5$, $-N(R^5)_2$, $+N(R^5)_3$, $-C(X)N(R^5)_2$, $-C(R^5)_2XR^5$, $-C(X)R^5$, $-C(X)XR^5$, $-S(O)R^5$, $-S(O)_2R^5$, $-S(O)OR^5$, $-S(O)_2OR^5$, $-S(O)N(R^5)_2$, $-S(O)_2N(R^5)_2$, $-OS(O)R^5$, $-OS(O)_2R^5$, $-OS(O)OR^5$, $-OS(O)_2OR^5$, $-P(O)(R^5)(OR^5)$, $-P(O)(OR^5)_2$, $-OP(O)(OR^5)_2$, $-Si(R^5)_3$, $-XC(X)R^5$, $-XC(X)XR^5$, $-XC(X)N(R^5)_2$, $-N(R^5)C(X)R^5$, $-N(R^5)C(X)XR^5$ y $-N(R^5)C(X)N(R^5)_2$, donde X es oxígeno o azufre y donde R^5 es tal y como se ha definido anteriormente.

[0151] Los ejemplos de unidades de conexión adecuados incluyen (poli)etilenglicol diamina (por ejemplo 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano o equivalentes que comprenden cadenas de etilenglicol más largas), polietilenglicol o cadenas de óxido de polietileno, polipropilenglicol o cadenas de óxido de polipropileno y 1,x-diaminoalcanos donde x es el número de átomos de carbono en el alcano.

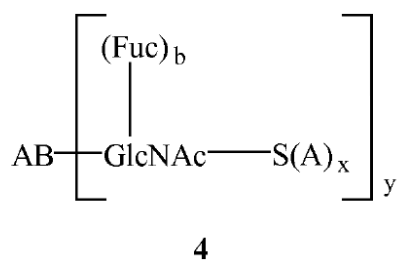
[0152] Otra clase de enlazadores adecuados comprende enlazadores escindibles. Los enlazadores escindibles se conocen en la técnica. Por ejemplo, Shabat *et al.*, Soft Matter 2012, 6, 1073, divulga enlazadores escindibles que comprenden fracciones autoinmolativas que se liberan tras sobre un detonante biológico, por ejemplo una escisión enzimática o un evento de oxidación. Algunos ejemplos de enlaces escindibles adecuados son enlazadores de péptido que se escinden tras el reconocimiento específico por una proteasa, por ejemplo, catepsina, plasmina o metaloproteasas, o enlazadores basados en glicósido que se escinden tras el reconocimiento específico por una glicosidasa, por ejemplo glucoronidasa, o nitroaromáticos que tienen pocas áreas hipóxicas pobres en oxígeno.

Conjugado de anticuerpo

[0153] El conjugado de anticuerpo para su uso según la invención se puede obtener mediante el proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo. Dicho proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo y los ejemplos de realización preferidos de dicho proceso se han descritos en detalle anteriormente.

[0154] El conjugado de anticuerpo para su uso según la invención se puede obtener mediante un proceso que comprende los pasos de:

(i) poner en contacto un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (GlcNAc) con un compuesto de fórmula $S(A)_x-P$ en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central es opcionalmente fucosilado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante de una galactosiltransferasa, donde $S(A)_x$ es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), para obtener un anticuerpo modificado, donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$ enlazado al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc- $S(A)_x$, y donde dicho anticuerpo modificado es según la fórmula (4):



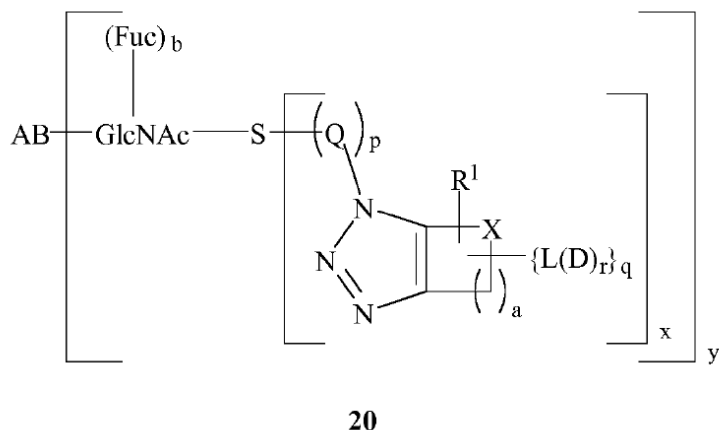
donde:

$S(A)_x$ y x son tal y como se ha definido anteriormente; AB representa un anticuerpo; GlcNAc es N-acetilglucosamina; Fuc es fucosa; b es 0 o 1; e y es de 1 a 20; y

(ii) hacer reaccionar dicho anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida y dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo y una o más moléculas de interés;

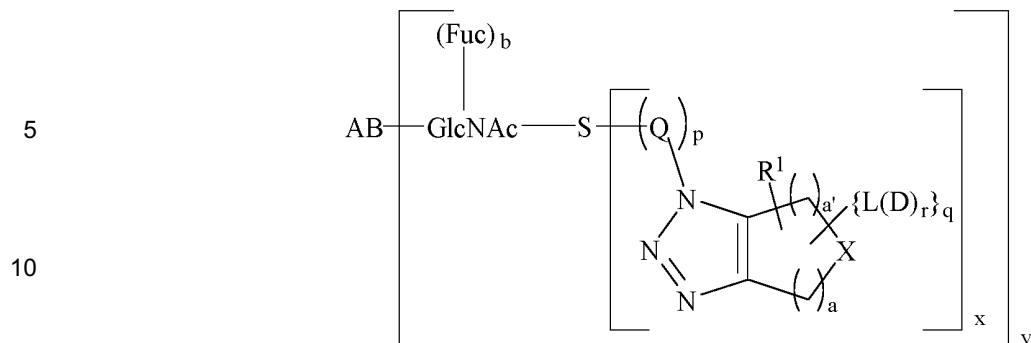
donde una molécula de interés (D) se conjuga al anticuerpo a través de un enlazador (L), y donde D y L son como se definen anteriormente.

[0155] El conjugado de anticuerpo para su uso según la invención puede ser según la fórmula (20):



donde AB es un anticuerpo, S es un azúcar o un derivado de azúcar, GlcNAc es N-acetilglucosamina, donde y es 1 - 20, y donde L, D, X, R^1 , Q, a, b, p, r, x, e y q son tal y como se ha definido anteriormente, así como sus formas de realización preferidas.

[0156] El conjugado de anticuerpo para su uso según la invención puede ser según la fórmula (20b):



15 donde AB es un anticuerpo, S es un
azúcar o un derivado **20b** de azúcar, GlcNAc es N-
acetilglucosamina, donde y es 1 - 20, y donde L, D, X, R¹, Q, a, a', b, p, r, x, e y q son tal y como se ha definido
anteriormente, así como sus formas de realización preferidas.

[0157] En el anticuerpo conjugado de la fórmula (20) y (20b), GlcNAc es opcionalmente fucosilada (b es 0 o 1). El anticuerpo puede comprender hasta 20 sustituyentes conjugados (y es 1 - 20). Preferiblemente y es 1 - 10, más preferiblemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, incluso más preferiblemente y es 1, 2, 3 o 4 y de la forma más preferible y es 1 o 2.

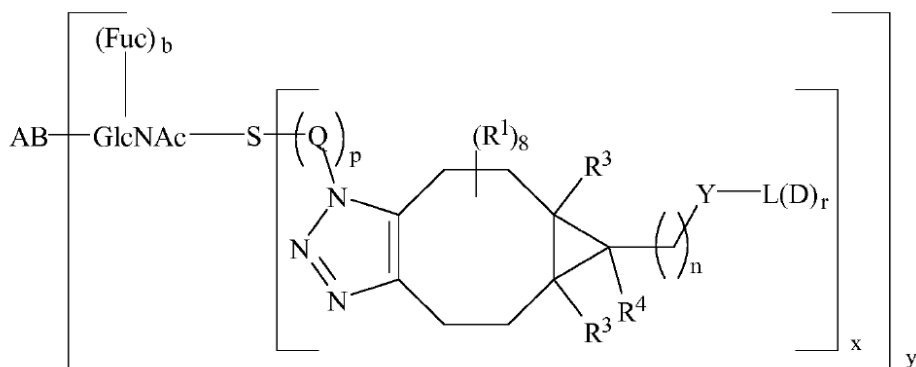
25 [0158] Las estructuras preferidas del derivado de azúcar (S), el enlazador (L), el sustituyente R¹ y los valores preferidos para r y a se han descrito en detalle anteriormente.

[0159] Como se describió anteriormente, el valor de p y la naturaleza de Q dependen del azúcar o derivado de azúcar sustituido con azida S(A)_x que está presente en el anticuerpo modificado con que se enlaza a un conjugado de enlazador. Si la azida en S(A)_x está presente en la posición C2, C3 o C4 del derivado de azúcar, entonces p es 0. Si S(A) es un derivado de azúcar de azidoacetamida, S(A)_x es por ejemplo GalNAz o GlcNAz, entonces p es 1 y Q es -N(H)C(O)CH₂-. Si la azida en S(A)_x está presente en la posición C6 posición del azúcar o el derivado de azúcar, entonces p es 1 y Q es -CH₂-.

35 [0160] Las moléculas de interés (D) también se han descrito con más detalle anteriormente. El conjugado de anticuerpo puede comprender más de una molécula de interés. Un conjugado de anticuerpo comprende más de una molécula de interés por ejemplo cuando se enlaza a más de un conjugado de enlazador, cuando un conjugado de enlazador comprende más de una molécula de interés, o ambos casos.

40 [0161] La molécula de interés es una sustancia activa y el conjugado de anticuerpo también se puede denominar conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

[0162] En una forma de realización preferida, el conjugado de anticuerpo tiene la fórmula (21):

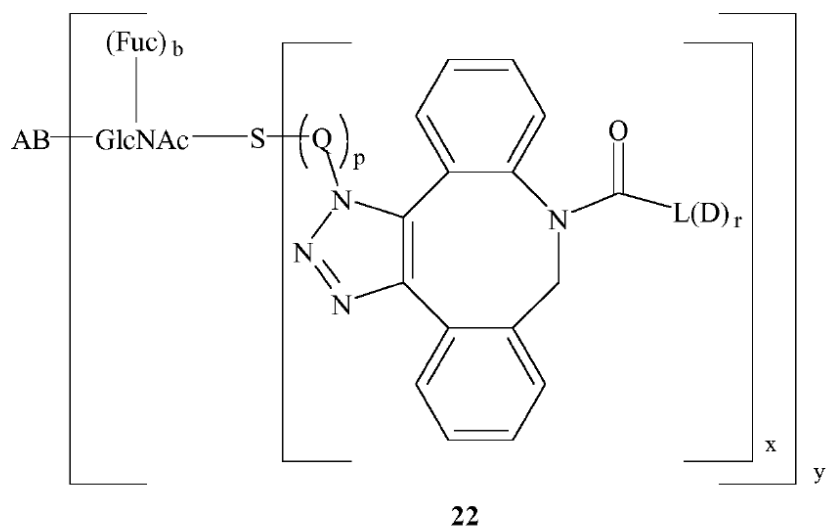


21

donde AB, L, D, Y, S, Q, x, y, b, p, R², GlcNAc, R¹, R³, R⁴, n y r son tal y como se ha definido anteriormente y donde dicha N-acetilglucosamina es opcionalmente fucosilada (b es 0 o 1).

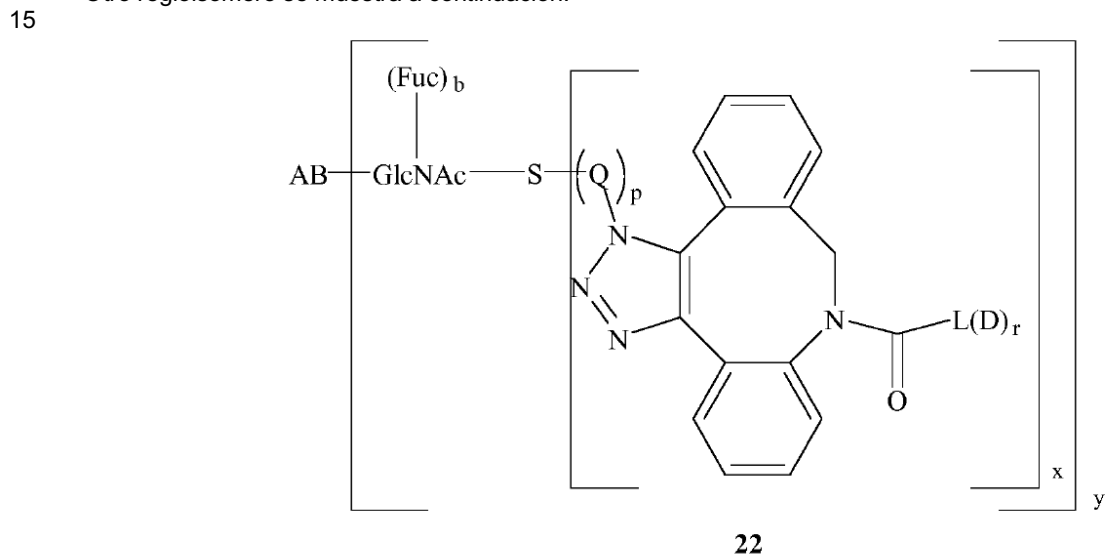
5 [0163] En otra forma de realización preferida, R¹, R³ y R⁴ son hidrógeno y n es 1 o 2, y en una forma de realización aún más preferida x es 1.

[0164] En otra forma de realización preferida, el conjugado de anticuerpo tiene la fórmula (22):



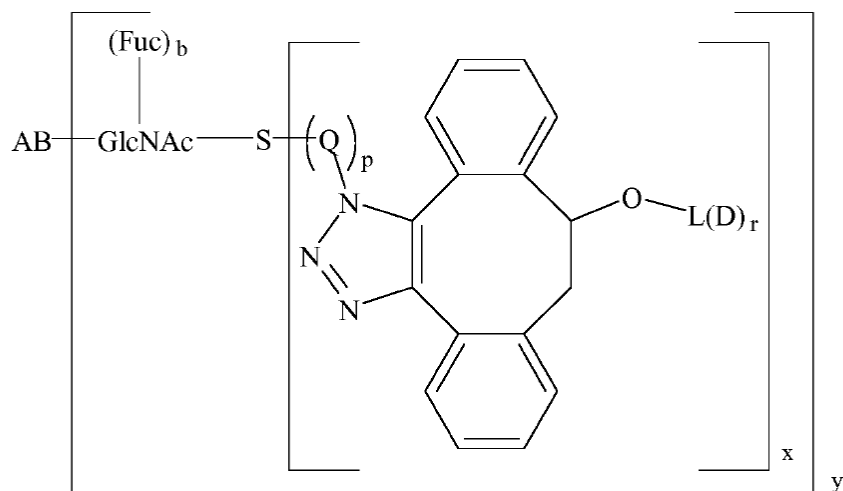
10 donde AB, L, D, X, S, b, p, x, y, Q y GlcNAc son tal y como se ha definido anteriormente, y donde dicha N-acetilglucosamina es opcionalmente fucosilada (b es 0 o 1).

[0165] El conjugado de anticuerpo 22 es un ejemplo de un compuesto que puede existir en diferentes regioisómeros. Otro regioisómero se muestra a continuación.



donde AB, L, D, X, S, b, p, x, y, Q y GlcNAc son tal y como se ha definido anteriormente, y donde dicha N-acetilglucosamina es opcionalmente fucosilada.

20 [0166] En otra forma de realización preferida, el conjugado de anticuerpo tiene la fórmula (15b):



15b

donde AB, L, D, X, S, b, p, x, y, Q y GlcNAc son tal y como se ha definido anteriormente, y donde dicha N-acetilglucosamina es opcionalmente fucosilada.

[0167] En la figura 6, se muestra otra forma de realización preferida del conjugado de anticuerpo para su uso según la invención. Un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras comprende una GlcNAc central opcionalmente fucosilada en cada cadena pesada. Un conjugado de enlazador según la fórmula (17) se conecta al anticuerpo mediante una reacción de cicloadición del grupo ciclooctinilo de dicho conjugado de enlazador con una azida en el anticuerpo modificado con azida con un sustituyente -GlcNAc-GalNAz.

[0168] La invención se refiere al conjugado de anticuerpo para su uso como medicamento. Los ejemplos de realización preferidos de dicho conjugado de anticuerpo se han descrito con más detalle anteriormente.

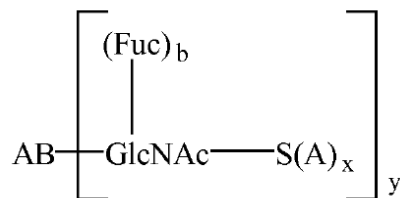
Conjugado anticuerpo-fármaco

[0169] Cuando la molécula de interés en un conjugado de anticuerpo es una sustancia activa, el conjugado de anticuerpo también se puede denominar conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco para su uso como medicamento, donde una molécula de interés (D) se conjuga al anticuerpo mediante un enlazador (L); donde dicha molécula de interés (D) es una sustancia activa; y donde una sustancia activa es una citotoxina.

[0170] La invención también se refiere a un conjugado de anticuerpo para su uso como medicamento, que se puede obtener mediante el proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo, donde una molécula de interés (D) se conjuga al anticuerpo mediante un enlazador (L); donde dicha molécula de interés (D) es una sustancia activa; y donde una sustancia activa es una citotoxina. Dicho proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo y los ejemplos de realización preferidos de dicho proceso se han descrito en detalle anteriormente.

[0171] En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo para su uso como medicamento, que se puede obtener mediante un proceso comprende los pasos de:

- (i) poner en contacto un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (GlcNAc) con un compuesto de fórmula $S(A)_x-P$ en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central es opcionalmente fucosilado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una galactosiltransferasa, donde $S(A)_x$ es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), para obtener un anticuerpo modificado, donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente $GlcNAc-S(A)_x$ enlazado al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente $GlcNAc-S(A)_x$, y donde dicho anticuerpo modificado es según la fórmula (4):



4

donde:

$\text{S}(\text{A})_x$ y x son tal y como se ha definido anteriormente; AB representa un anticuerpo; GlcNAc es N-acetilglucosamina; Fuc es fucosa; b es 0 o 1; e y es de 1 a 20; y

(ii) hacer reaccionar dicho anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida y dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo y una o más moléculas de interés;

donde una molécula de interés (D) se conjuga al anticuerpo a través de un enlazador (L); donde dicha molécula de interés (D) es una sustancia activa; y donde una sustancia activa es una citotoxina.

[0172] Las moléculas de interés (D) y los enlazadores (L) se han descrito con más detalle anteriormente y se describen con más detalle a continuación.

[0173] El paso (i) y el paso (ii) del proceso mediante el cual se puede obtener el conjugado anticuerpo-fármaco, así como las formas de realización preferidas del mismo, se han descrito con más detalle anteriormente.

[0174] El conjugado anticuerpo-fármaco se puede obtener preferiblemente mediante el proceso, donde x es 1 o 2, y más preferiblemente, x es 1. En consecuencia, en el anticuerpo modificado según la fórmula (4) al igual que en el conjugado anticuerpo-fármaco, cada fracción de azúcar S se enlaza preferiblemente a 1 o 2, más preferiblemente 1, conjugados de enlazador $\text{L}(\text{D})_r$.

[0175] El conjugado anticuerpo-fármaco se obtiene preferiblemente mediante el proceso, donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, más preferiblemente y es 1, 2, 3 o 4 e incluso más preferiblemente, y es 1 o 2. Se prefiere además que r sea 1, 2, 3 o 4, más preferiblemente que r sea 1 o 2 y de la forma más preferible que r sea 1.

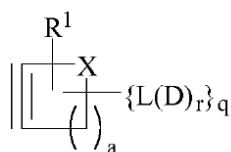
[0176] Se prefiere, además, que, en el conjugado anticuerpo-fármaco, el anticuerpo sea un anticuerpo entero, donde y sea 2. En esta forma de realización, el conjugado anticuerpo-fármaco se puede enlazar así a 2, 4 o 8 moléculas de interés, más preferiblemente el anticuerpo se enlaza a 2 o 4 moléculas de interés y de la forma más preferible el anticuerpo se enlaza a 2 moléculas de interés.

[0177] En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se selecciona del grupo que consta de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, más preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo IgG, preferiblemente un anticuerpo IgG1.

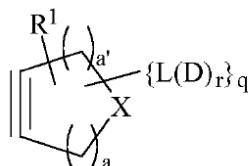
[0178] En otra forma de realización del conjugado anticuerpo-fármaco, el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo. En esta forma de realización, se prefiere que y sea 1.

[0179] En otra forma de realización preferida, x es 1 e y es 1. En otra forma de realización preferida, x es 2 e y es 2. Se prefiere además que r sea 1. En otra forma de realización preferida, x es 1, y es 1 y r es 1. En otra forma de realización preferida adicional, x es 1, y es 2 y r es 1. En otra forma de realización preferida adicional, x es 2, y es 2 y r es 1.

[0180] En una forma de realización preferida, el conjugado anticuerpo-fármaco se puede obtener mediante el proceso, donde, en el paso ii), dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida, y donde dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (11) o (11b):



11



11b

donde:

D y L son tal y como se ha definido anteriormente;

r es 1 - 20;

R¹ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, -OR⁵, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁵, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄ y donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen opcionalmente, donde dos sustituyentes R¹ se pueden enlazar juntos para formar un cicloalquilo anillado o un sustituyente (hetero)areno anillado, y donde R⁵ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄;

X es C(R¹)₂, O, S o NR², donde R² es R¹ o L(D), donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente;

q es 0 o 1, con la condición de que si q es 0, entonces X es N-L(D);

a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;

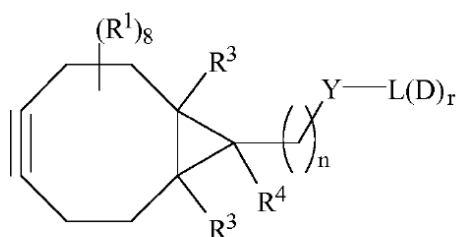
a' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8; y

a + a' < 10.

[0181] Preferiblemente, a + a' es 4, 5, 6 o 7, más preferiblemente a + a' es 4, 5 o 6 y, de la forma más preferible, a + a' es 5.

[0182] En otra forma de realización preferida, el conjugado anticuerpo-fármaco para su uso según la invención se puede obtener mediante el proceso, donde, en el paso (ii), dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida y donde dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (12), (13), (14), (15) o (16).

[0183] En otra forma de realización preferida adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco para su uso según la invención se puede obtener mediante el proceso, donde, en el paso (ii), dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida y donde dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (17):



17

donde:

R¹, L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente;

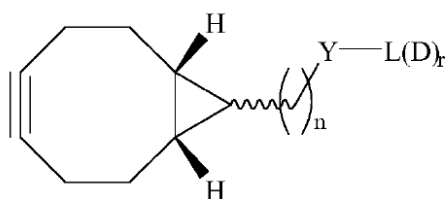
Y es O, S o NR², donde R² es tal y como se ha definido anteriormente;

R³ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄;

R⁴ se selecciona del grupo que consta de hidrógeno, Y-L(D)r, -(CH₂)n-Y-L(D)r, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄, donde los grupos alquilo se interrumpen opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consta

de O, N y S, donde los grupos alquilo, (grupos hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen de manera independiente opcionalmente; y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

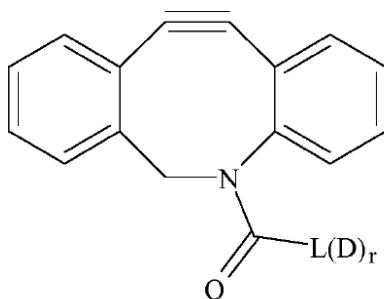
- 5 [0184] En otra forma de realización preferida adicional, R¹ es hidrógeno. En otra forma de realización preferida, R³ es hidrógeno. En otra forma de realización preferida, n es 1 o 2. En otra forma de realización preferida, R⁴ es hidrógeno, Y-L(D)_r o -(CH₂)_n-Y-L(D)_r. En otra forma de realización preferida, R² es hidrógeno o L(D)_r. En otra forma de realización preferida, el conjugado de enlazador tiene la fórmula **18**:



BCN-L(D)_r **18**

10 donde Y, L, D, n y r son tal y como se ha definido anteriormente.

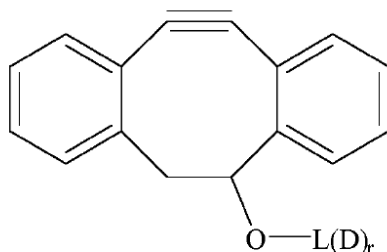
- 15 [0185] En otra forma de realización preferida adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco para su uso según la invención se puede obtener mediante el proceso, donde, en el paso (ii), dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida y donde dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (**19**):



19

donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente.

- 20 [0186] En otra forma de realización preferida adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco para su uso según la invención se puede obtener mediante el proceso, donde, en el paso (ii), dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida y donde dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (**15**):



15

25 donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente.

[0187] Los experimentos de eficacia *in vivo* muestran que el conjugado anticuerpo-fármaco para su uso según la invención tiene un efecto sobre el volumen del tumor.

5 [0188] La invención se refiere, además, a un conjugado anticuerpo-fármaco, donde la molécula de interés es una citotoxina, para su uso como medicamento.

[0189] La invención también se refiere al uso de un conjugado anticuerpo-fármaco, donde la molécula de interés es una citotoxina para su uso, en el tratamiento del cáncer.

10 [0190] La invención se refiere, además, a un conjugado anticuerpo-fármaco, donde la molécula de interés es una citotoxina, para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, más preferiblemente para su uso en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

15 [0191] En una forma de realización preferida, el anticuerpo en dicho conjugado anticuerpo-fármaco es trastuzumab. En otra forma de realización preferida, la citotoxina es maitansinoide, auristatina E, auristatina F, duocarmicina o pirrolobenzodiazepina.

20 [0192] En el conjugado anticuerpo-fármaco para su uso según la invención, la molécula de interés es una sustancia activa. Como se describió anteriormente, una sustancia activa es una sustancia farmacológica, es decir, una sustancia que es farmacéuticamente activa. La sustancia activa es una citotoxina. Los ejemplos de citotoxinas incluyen camptotecinas, staurosporina, doxorubicina, daunorubicina, colchicina, metotrexato, taxanos, calicheamicinas, duocarmicinas, maitansinas y maitansinoides (es decir, derivados de maitansina), auristatinas, tubulisin M, criptoficina o pirrolobenzodiazepinas (PBD). Los ejemplos de auristatinas incluyen dolastatina 10, auristatina F, monometil auristatina F (MMAF), auristatina E, monometil auristatina E (MMAE), auristatina PE, auristatina TP y auristatina AQ. Los ejemplos de maitansinas y maitansinoides incluyen mertansina y ansamitocina. El anticuerpo en dicho conjugado de anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de cáncer. Los ejemplos de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de cáncer incluyen trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, rituximab, bevacizumab, girentuximab, gemtuzumab, inotuzumab, alemtuzumab, tositumumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, elotuzumab, zanolimumab, obinutuzumab, necitumumab, farletuzumab, vedolizumab, tabalumab, itolizumab, ocrelizumab, epratuzumab, mepolizumab, reslizumab, sarilumab y ramicurumab.

35 [0193] Por lo tanto, la invención se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a antígeno de cáncer y donde la molécula de interés es una citotoxina, para su uso como medicamento. La invención también se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a antígeno de cáncer y donde la molécula de interés es una citotoxina, para su uso en el tratamiento del cáncer. Además, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a antígeno de cáncer y donde la molécula de interés es una citotoxina, para su uso en el tratamiento del cáncer de mama y, más preferiblemente, para su uso en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

45 [0194] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el conjugado de anticuerpo es trastuzumab-(MMAF)₂, trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)₂, trastuzumab(maitansinoide)₂ o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)₂, para usar en el tratamiento del cáncer. En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el conjugado de anticuerpo es trastuzumab-(MMAF)₂, trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)₂, trastuzumab(maitansinoide)₂ o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)₂, para usar en el tratamiento del cáncer de mama, más preferiblemente para usar en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

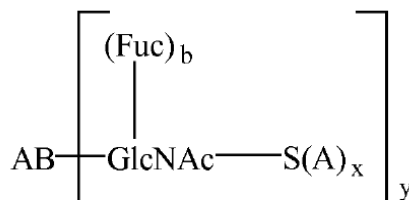
50 **Proceso de preparación de un conjugado fármaco-anticuerpo**

[0195] El conjugado anticuerpo-fármaco para su uso según la invención se puede preparar según el proceso que comprende los pasos de:

55 (i) poner en contacto un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (GlcNAc) con un compuesto de fórmula S(A)_x-P en presencia de un catalizador adecuado, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central es opcionalmente fucosilado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una galactosiltransferasa, donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP),

60

para obtener un anticuerpo modificado, donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x enlazado al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x, y donde dicho anticuerpo modificado es según la fórmula (4):



4

donde:

S(A)_x y x son tal y como se ha definido anteriormente; AB representa un anticuerpo; GlcNAc es N-acetilglucosamina; Fuc es fucosa; b es 0 o 1; E y es 1 a 20; y

(ii) hacer reaccionar dicho anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azid y dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquilino y una o más moléculas de interés;

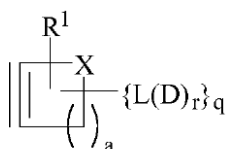
donde una molécula de interés (D) se conjuga al anticuerpo mediante un enlazador (L); donde dicha molécula de interés es una sustancia activa; y donde una sustancia activa es una citotoxina.

[0196] En una forma de realización preferida, dicho catalizador es un catalizador que comprende un dominio catalítico mutante a partir de una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, preferiblemente seleccionado del grupo que consta de GalT Y289L, GalT Y289N y GalT Y289I. En otra forma de realización preferida, dicho catalizador es un catalizador que comprende un dominio catalítico mutante a partir de una $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa, seleccionado del grupo que consta de GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I y GalT Y289A, preferiblemente seleccionado del grupo que consta de GalT Y289F y GalT Y289M.

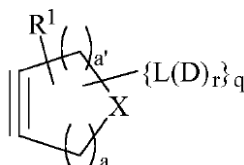
[0197] En otra forma de realización preferida, x es 1, 2, 3 o 4, preferiblemente x es 1 o 2, más preferiblemente x es 1. En otra forma de realización preferida, y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, preferiblemente y es 1, 2, 3 o 4 y más preferiblemente y es 1 o 2.

[0198] En una forma de realización preferida específica, el anticuerpo es un anticuerpo entero e y es 2 y, en otra forma de realización preferida, el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo e y es 1.

[0199] En una forma de realización preferida del proceso de preparación de un conjugado de anticuerpo, dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida, y dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (11) o (11b):



11



11b

donde:

D y L son tal y como se ha definido anteriormente;

res 1 - 20;

R¹ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, -OR⁵, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁵, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄ y donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen opcionalmente, donde dos sustituyentes R¹ se pueden enlazar juntos para formar un cicloalquilo anillado o un sustituyente (hetero)areno anillado, y donde R⁵ se selecciona independientemente del grupo que

consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$;

X es $C(R^1)_2$, O, S o NR^2 , donde R^2 es R^1 o $L(D)_r$, donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente;

q es 0 o 1, con la condición de que si q es 0, entonces X es $N-L(D)_r$; y

a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8; y

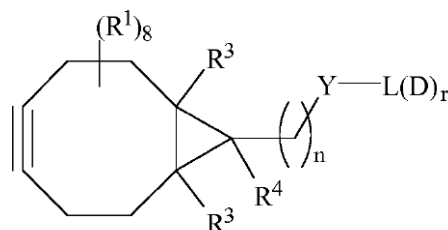
a' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8; y

$a + a' < 10$.

[0200] Preferiblemente, $a + a'$ es 4, 5, 6 o 7, más preferiblemente $a + a'$ es 4, 5 o 6 y, de la forma más preferible, $a + a'$ es 5.

[0201] En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida, y dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (12), (13), (14), (15) o (16).

[0202] En otra forma de realización preferida adicional, dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida, y dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (17):



17

donde:

R^1 , L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente;

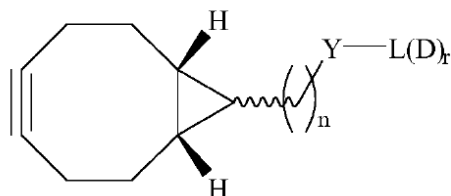
Y es O, S o NR^2 , donde R^2 es tal y como se ha definido anteriormente;

R^3 se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$;

R^4 se selecciona del grupo que consta de hidrógeno, $Y-L(D)_r$, $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$, halógeno, grupos alquilo $C_1 - C_{24}$, grupos (hetero)arilo $C_6 - C_{24}$, grupos alquil(hetero)arilo $C_7 - C_{24}$ y grupos (hetero)arilalquilo $C_7 - C_{24}$, donde los grupos alquilo se interrumpen opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consta de O, N y S, donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen de manera independiente opcionalmente; y

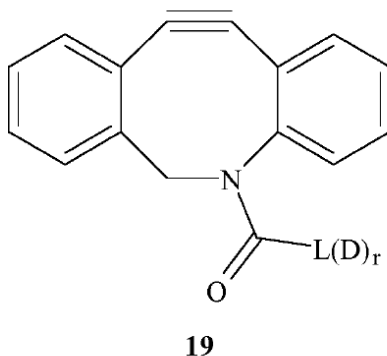
n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

[0203] En otra forma de realización preferida, R^1 es hidrógeno. En otra forma de realización preferida, R^3 es hidrógeno. En otra forma de realización preferida, n es 1 o 2. En otra forma de realización preferida, R^4 es hidrógeno, $Y-L(D)_r$ o $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$. En otra forma de realización preferida, R^2 es hidrógeno o $L(D)_r$. En otra forma de realización preferida, el conjugado de enlazador tiene la fórmula 18:

BCN- $L(D)_r$ 18

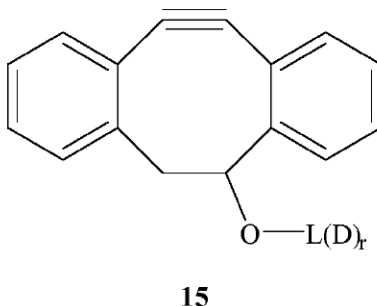
donde Y, L, D, n y r son tal y como se ha definido anteriormente.

[0204] En otra forma de realización preferida adicional, dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida, y dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (19):



5 donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente.

[0205] En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo modificado con azida, y dicho conjugado de enlazador tiene la fórmula (15):



10 donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente.

Anticuerpo modificado, conjugado de anticuerpo y conjugado de anticuerpo-fármaco

15 [0206] El anticuerpo modificado, el conjugado de anticuerpo, el conjugado anticuerpo-fármaco y los procesos de preparación de los mismos tienen diferentes ventajas sobre los anticuerpos modificados, conjugados de anticuerpos y procesos de preparación de los mismos conocidos en la técnica.

20 [0207] Como se describió anteriormente, los procesos conocidos para la conjugación de una toxina de enlazador a anticuerpos todavía necesitan ser mejorados, no solo en cuanto a control tanto de la especificidad del sitio como de estequiometría, sino también en cuanto a la eficiencia del proceso de conjugación. A pesar de la capacidad de los ADC para alojarse en uno de sus objetivos, la cantidad de fármaco que se estima que entra en las células de los tumores internos es típicamente < 2 % de una dosis administrada. Este problema se amplifica por los resultados de conjugación imprevisibles de los ADC conocidos en la técnica. Resulta importante evitar anticuerpos infraconjugados, que reducen la potencia, así como especies altamente conjugadas, que pueden tener vidas medias circulantes marcadamente disminuidas, unión dificultada a la proteína objetivo y toxicidad aumentada.

30 [0208] Para conjugados anticuerpo-fármaco, una medida para la carga de moléculas de interés (por ejemplo fármacos, sustancias activas) sobre el anticuerpo es la así llamada proporción de fármaco por anticuerpo (DAR), que da el número medio de moléculas de sustancia activa por anticuerpo, calculado a partir de una distribución estadística. El valor de máximo teórico de la DAR para un tipo determinado de ADC es igual al número de sitios de anclaje. Como se describió anteriormente, los procesos de preparación de ADC conocidos del estado de la técnica dan como resultado generalmente un producto que comprende una mezcla de conjugados de anticuerpos con un número variable de moléculas de interés presentes en cada conjugado de anticuerpo, y una DAR con una desviación típica alta.

[0209] Una de las ventajas de la invención es que estos anticuerpos y conjugados de anticuerpos son homogéneos, tanto en especificidad del sitio como en estequiometría. La invención, por lo tanto, también se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco para su uso, donde el conjugado anticuerpo-fármaco es homogéneo. Se prefiere además que el conjugado anticuerpo-fármaco sea homogéneo en especificidad del sitio y estequiometría. También se prefiere que el conjugado anticuerpo-fármaco se obtenga con una proporción de fármaco por anticuerpo (DAR) cercana al valor teórico, y con una desviación típica baja.

[0210] En una forma de realización preferida, el anticuerpo modificado y el conjugado de anticuerpo son homogéneos, tanto en especificidad del sitio como en estequiometría. Aquí, un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo se considera homogéneo cuando la conjugación se efectúa solo en un sitio predeterminado y con proporción de fármaco-anticuerpo predeterminada. Un conjugado de anticuerpo es heterogéneo cuando la conjugación del anticuerpo tiene lugar en sitios diferentes en el anticuerpo, lo que conduce a una mezcla de productos con proporción de fármaco-anticuerpo imprevisible. En este último caso, la proporción de fármaco-anticuerpo será un promedio del grupo entero de conjugados anticuerpo-fármaco.

[0211] En otra forma de realización preferida, el conjugado de anticuerpo para su uso según la invención tiene una DAR que está dentro del 10 % de su valor teórico.

[0112] Dichos anticuerpos modificados y conjugados de anticuerpos se obtienen con una DAR muy cercana al valor teórico, y con una desviación típica muy baja. Esto también significa que los conjugados de anticuerpos para su uso según la invención suponen un producto más consistente para el análisis preclínico.

[0213] Otra ventaja de la invención implica la reducción de residuos en la fabricación, lo que mejora así el coste de los productos de las empresas.

[0214] Además, el proceso de preparación de un anticuerpo modificado y de preparación de un anticuerpo conjugado transcurre muy eficazmente. Las cinéticas de reacción son muy favorables, lo que da como resultado una conversión casi completa en un periodo de tiempo relativamente corto, particularmente en comparación con procesos conocidos en la técnica, y no se forman productos secundarios o no se forma casi ninguno.

[0215] Además, cuando un anticuerpo modificado con azida se acopla a un conjugado de enlazador que comprende un grupo alquínico mediante una reacción de cicloadición, los triazoles resultantes no son susceptibles a hidrólisis u otras vías de degradación.

[0216] Por lo tanto, las ventajas adicionales son la estabilidad de los conjugados de anticuerpos para su uso según la invención, así como el proceso directo y generalmente aplicable para la introducción de un grupo azida en un anticuerpo.

[0217] Como se ha descrito anteriormente, los conjugados de anticuerpos para su uso según la invención tienen diferentes ventajas sobre los conjugados de anticuerpos conocidos en el estado de la técnica. Una de las ventajas de los anticuerpos modificados, los conjugados de anticuerpos y el proceso de preparación de los mismos es que estos anticuerpos y conjugados de anticuerpos son homogéneos, tanto en especificidad del sitio como en estequiometría.

[0218] Los anticuerpos modificados y conjugados de anticuerpos para su uso según la invención se obtienen con una DAR muy cercana al valor teórico, y con una desviación típica muy baja. Esto también significa que los conjugados de anticuerpos para su uso según la invención dan como resultado un producto más consistente para el análisis preclínico.

[0219] Las propiedades de un conjugado de anticuerpo para su uso según la invención se modulan mediante el diseño, la expresión y el procesado en los conjugados anticuerpo-fármaco de anticuerpos monoclonales con perfiles de glicosilación diferentes. Las propiedades que se pueden modular son, por ejemplo, actividad antitumoral, dosis máxima tolerada, farmacocinéticas tales como espacio libre de plasma, índice terapéutico, tanto en cuanto a eficacia como toxicidad, atenuación del fármaco, estabilidad de la fijación del fármaco y liberación del fármaco después de alcanzar el objetivo. En particular, hay una correlación entre la ubicación del fármaco y la eficacia *in vivo* del ADC.

[0220] Los experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que el conjugado de anticuerpo para su uso según la invención tiene un efecto citotóxico en células con expresión de HER2. Los experimentos *in vitro* demuestran que los conjugados anticuerpo-fármaco para su uso según la invención son capaces de matar selectivamente la línea celular con expresión de HER2 con respecto a la línea celular con HER2 negativo, como se resume en las figuras 24 - 26. El experimento *in vivo* demuestra que una dosis individual de varios de los conjugados de anticuerpos para su uso según la invención es capaz de eliminar un tumor con expresión de HER2 a partir de un xenoinjerto de ratón, como

se clarifica en las figuras 29 y 30. Además, se demuestra que los conjugados de anticuerpos para su uso según la invención tienen un perfil farmacocinético idéntico al del anticuerpo nativo trastuzumab, como se resume en la figura 27.

5 [0221] Por lo tanto, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo para su uso como medicamento. La invención también se refiere a un conjugado de anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer. La invención se refiere, además, a un conjugado de anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, más preferiblemente para su uso en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

10 [0222] La molécula de interés en dicho conjugado de anticuerpo es una citotoxina. Los ejemplos de citotoxinas incluyen camptotecinas, staurosporina, doxorubicina, daunorrubicina, colchicina, metotrexato, taxanos, calicheamicinas, duocarmicinas, maitansinas y maitansinoides (es decir, derivados de maitansina), auristatinas, tubulisina M, criptoficina o pirrolobenzodiazepinas (PBD). Los ejemplos de auristatinas incluyen dolastatina 10, auristatina F, monometil auristatina F (MMAF), auristatina E, monometil auristatina E (MMAE), auristatina PE, auristatina TP y auristatina AQ. Los ejemplos de maitansinas y maitansinoides incluyen mertansina y ansamitocina.

15 [0223] El anticuerpo en dicho conjugado de anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de cáncer. Los ejemplos de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de cáncer incluyen trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, rituximab, bevacizumab, girentuximab, gemtuzumab, inotuzumab, alemtuzumab, tositumumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, elotuzumab, zanolimumab, obinutuzumab, necitumumab, farletuzumab, vedolizumab, tabalumab, itolizumab, ocrelizumab, epratuzumab, mepolizumab, reslizumab, sarilumab y ramcurumab.

20 [0224] Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a antígeno de cáncer y donde la molécula de interés es una citotoxina, para usar como un medicamento. En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a antígeno de cáncer y donde la molécula de interés es una citotoxina, para su uso en el tratamiento del cáncer. En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a antígeno de cáncer y donde la molécula de interés es una citotoxina, para usar en el tratamiento del cáncer de mama, y más preferiblemente para usar en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

25 [0225] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el conjugado de anticuerpo es trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)₂ o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)₂, para usar en el tratamiento del cáncer. En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo, donde el conjugado de anticuerpo es trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)₂ o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)₂, para usar en el tratamiento del cáncer de mama, más preferiblemente para usar en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

40 Ejemplos

Síntesis

45 *Ejemplos 1 - 4: Síntesis de BCN-doxorrubicina 28a y 28b*

[0226] El esquema de reacción de la síntesis de conjugado de enlazador BCN-doxorrubicina 28a empezando a partir de BCN-OSu 23, como se realiza en los ejemplos 1 - 4, se muestra en la figura 7.

50 *Ejemplo 1. Síntesis de BCN-amina 24*

[0227] A una solución de 2,2'-(etilenodioxo)bis(etilamina) (11,78 mL, 80,5 mmol) en DCM (200 mL) se añadió BCN-OSu **23** (7,82 g, 26,8 mmol) en DCM (100 mL) gota a gota durante 3 h. Después de la adición completa, se agitó la mezcla durante 10 min seguido de lavado con NH₄Cl acuoso saturado (3 × 200 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró *in vacuo*. La cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-93:7 + 1 % Et₃N) dio producto **24** (5,95 g, 54,7 mmol, 68 %). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5,38 (s, 1H), 4,13 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 3,59 (s, 4H), 3,56-3,50 (m, 4H), 3,35 (q, J = 5,1 Hz, 2H), 2,88 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 2,32 (br s, 2H), 2,27-2,15 (m, 6H), 1,62-1,42 (m, 2H), 1,33 (qn, J = 8,7 Hz, 1H), 0,97-0,85 (m, 2H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 156,4, 98,3, 68,7 (2C), 62,2, 45,5, 40,3, 40,2, 28,6, 20,9, 19,6, 17,3. HRMS (ESI⁺) calculado para C₁₇H₂₈N₂NaO₄ (M⁺Na⁺) 347,1947, hallado 347,1952.

Ejemplo 2. Síntesis de BCN-biotina 25

[0228] A una solución de derivado de BCN **24** (0,80 g, 2,47 mmol) en DCM (25 mL) se añadieron biotina-OSu (0,93 g, 2,71 mmol) y Et₃N (0,86 mL, 6,16 mmol). La mezcla reactiva se agitó durante 5 h y se añadió después NaHCO₃ (20 mL) acuoso saturado. La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ (2 × 20 mL) acuoso saturado, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-92:8) biotina BCN suministró **25** (1,14 g, 2,1 mmol, 84 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,57 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,48 (s, 1H), 5,37 (s, 1H), 4,52-4,48 (m, 1H), 4,33-4,30 (m, 1H), 4,16 (d, J = 8 Hz, 2H), 3,62 (s, 4H), 3,57 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,45 (q, J = 5,2 Hz, 2H), 3,40-3,36 (m, 2H), 3,17-3,12 (m, 1H), 2,92 (dd, J = 8, 4,8 Hz, 1H), 2,72 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 2,33-2,18 (m, 8H), 1,88 (br s, 1H), 1,80-1,57 (m, 6H), 1,49-1,33 (m, 3H), 0,95 (t, J = 9,6 Hz, 2H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 172,9, 163,6, 156,4, 98,3, 69,6, 61,3, 59,7, 55,2, 40,3, 40,0, 38,7, 35,5, 28,6, 27,8, 27,6, 25,1, 21,0, 19,7, 17,3. HRMS (ESI+) calculado para C₂₇H₄₃N₄O₆S (M+H⁺) 551,2903, hallado 551,2911.

Ejemplo 3. Síntesis de éster activado 26

[0229] BCN-amina **24** (3,6 g, 11,1 mmol) se disolvió en DCM (150 mL) y se añadieron anhídrido glutárico (1,39 g, 12,2 mmol) y Et₃N (4,61 mL, 33,3 mmol). La mezcla reactiva se agitó durante 2 h seguido de adición de DSC (4,3 g, 16,7 mmol). Después de 2 h, la reacción se apagó con H₂O (100 mL) y la capa orgánica se lavó con agua (2 × 150 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró *in vacuo*. La cromatografía en columna flash (EtOAc:MeOH 99:1-94:6) suministró éster activado **26** (4,63 g, 8,6 mmol, 78 %).

[0230] ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 4,14 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 3,59 (s, 4H), 3,57-3,52 (m, 4H), 3,44 (q, J = 5,1 Hz, 2H), 3,35 (q, J = 4,8 Hz, 2H), 2,83 (br s, 4H), 2,67 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,33-2,16 (m, 7H), 2,08 (qn, J = 6,9 Hz, 2H), 1,65-1,49 (m, 2H), 1,33 (t, J = 9,0 Hz, 1H), 0,97-0,87 (m, 2H). LRMS (ESI+) calculado para C₂₆H₃₇N₃O₉ (M+H⁺) 536,26, hallado 536,0.

Ejemplo 4. Síntesis de conjugado BCN-doxorrubicina 28a

[0231] A una solución de éster activado **26** (5 mg, 0,0093 mmol) y doxorrubicina-HCl (27,10 mg, 0,017 mmol) en DMF (0,5 mL) se añadió Et₃N (5 µL, 0,036 mmol) y la mezcla se agitó durante toda la noche. El solvente se extrajo bajo presión reducida y el producto bruto se purificó con cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-80:20) para suministrar BCN-doxorrubicina **28a** (6 mg, 0,0062 mmol, 66 %). LRMS (ESI+) calculado para C₄₉H₆₁N₃O₁₇ (M+H⁺) 964,4, hallado 963,9.

Ejemplo 4-2. Síntesis de conjugado BCN-doxorrubicina 28b

[0232] A una solución de H₂N-PEG₈-COOH (822 mg, 1,86 mmol) en THF:H₂O 1:1 (20 mL) se añadieron BCN-OSu (**23**) (651 mg, 2,23 mmol) y Et₃N (774 µL, 5,59 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h y se acidificó a pH 1 seguido de extracción con EtOAc (3 × 35 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el solvente se extrajo bajo presión reducida. El producto bruto se disolvió entonces en DCM seco (20 mL) y posteriormente se añadieron DCC (461 mg, 2,23 mmol) y NHS (257 mg, 2,23 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se filtró y el filtrado se concentró *in vacuo*. La cromatografía en columna flash (MeCN, MeCN:H₂O 30:1) suministró BCN-PEG₈-COOSu.

[0233] ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5,44 (br s, 1H), 4,14 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 3,84 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 3,68-3,63 (m; 30H), 3,56 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,34 (q, J = 5,4 Hz, 2H), 2,90 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,85 (s, 4H), 2,36-2,14 (m, 6H), 1,72-1,49 (m, 2H), 1,36 (qn, J = 8,7 Hz, 1H), 1,02-0,88 (m, 2H). LRMS (ESI+) calculado para C₃₄H₅₄N₂O₁₄ (M+Na⁺) 737,35, hallado 737,3.

[0234] A una solución de doxorrubicina-HCl (**27**, 500 mg, 0,862 mmol) en DMF anhidro (10 mL) se añadieron trietilamina (361 µL, 262 mg, 2,59 mmol) y una solución de BCN-PEG₈-COOSu (678 mg, 0,948 mmol) en DMF (10 mL). La mezcla resultante se agitó durante 22 h y se concentró con 3 g de gel de sílice. Después de la purificación mediante cromatografía en columna, el producto se obtuvo como un material amorfo rojo (757 mg, 0,66 mmol, 77 %).

[0235] LRMS (HPLC, ESI-) calculado para C₅₇H₇₇N₂O₂₂ (M-H⁺) 1141,5, hallado 1142,2.

Ejemplo 5. Síntesis de DIBAC-biotina 30 (representada esquemáticamente en la figura 8)

[0236] A una solución de amina **29**, disponible comercialmente de ClickChemistryTools (50 mg, 0,18 mmol) en DMF (2 mL) se añadió biotina-OSu (62 mg, 0,18 mmol) y Et₃N (50 µL, 0,36 mmol). La mezcla reactiva se agitó durante 3 h seguido de concentración bajo presión reducida. La cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-90:10)

suministró DIBAC-biotina **30** (44 mg, 0,09 mmol, 49 %). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,66-7,62 (m, 1H), 7,40-7,24 (m, 7H), 6,67-6,60 (m, 1H), 6,53-6,49 (m, 1H), 5,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,13 (dd, *J* = 2,9,14,0 Hz, 1H), 4,47-4,43 (m, 1H), 4,29-4,28 (m, 1H), 3,68 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H), 3,34-3,30 (m, 1H), 3,17-3,08 (m, 2H), 2,92-2,67 (m, 3H), 2,50-2,42 (m, 1H), 2,10-1,95 (m, 2H), 1,73-1,24 (m, 6H). LRMS (ESI+) calculado para C₂₈H₃₀N₄O₃S (*M*+H⁺) 503,2, hallado 503,1.

Ejemplos 6 - 9: Síntesis de conjugado BCN-doxorrubicina **35**

[0237] El esquema de reacción para la síntesis del conjugado de BCN-doxorrubicina **35** a partir de Fmoc-citrulina **31**, como se realiza en los ejemplos 7 - 10, se muestra en la figura 9.

Ejemplo 6. Síntesis de derivado de citrulina **32**

[0238] Se añadieron isobutilcloroformato (99 µL, 0,76 mmol) y N-metilmorfolina (83 µL, 0,76 mmol) a una solución de Fmoc-citrulina **31** (300 mg, 0,76 mmol) en THF a -40 °C. La solución se agitó durante 2 h seguido de la adición de p-aminobenzilalcohol (112 mg, 0,91 mmol) y N-metilmorfolina (100 µL, 0,91 mmol). Después de agitar 1 h la solución se calentó a temperatura ambiente y después de 2 h la mezcla reactiva se concentró bajo presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-80:20) suministró derivado de citrulina **32** (346 mg, 0,69 mmol, 90 %). LRMS (ESI+) calculado para C₂₈H₃₀N₄O₅ (*M*+H⁺) 503,2, hallado 503,1.

Ejemplo 7. Síntesis de dipéptido **33**

[0239] El derivado de citrulina **32** (100 mg, 0,20 mmol) se disolvió en DMF (1,6 mL) y se añadió piperidina (333 µL). Después de 2 h, la reacción se concentró bajo presión reducida y el producto bruto se disolvió en DMF (2 mL). Se añadieron Alloc-Val-OSu (60 mg, 0,20 mmol) y Et₃N (58 µL, 0,40 mmol), la mezcla se agitó durante toda la noche y posteriormente se concentró *in vacuo*. La purificación mediante cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-90:10) suministró dipéptido **33** (65 mg, 0,14 mmol, 70 %). LRMS (ESI+) calculado para C₂₂H₃₃N₅O₆ (*M*+H⁺) 464,2, hallado 464,0.

Ejemplo 8. Síntesis de dipéptido-doxorrubicina **34**

[0240] A una solución de dipéptido **33** (40 mg, 0,086 mmol) en DMF (0,5 mL) se añadieron Et₃N (36 µL, 0,26 mmol) y DSC (66 mg, 0,26 mmol). La mezcla reactiva se agitó durante toda la noche seguido de concentración bajo presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-90:10) suministró el producto (30 mg, 0,05 mmol, 58 %) que se disolvió inmediatamente en DMF (0,5 mL). Doxorrubicina HCl **27** (29 mg, 0,05 mmol) y Et₃N (20 µL, 0,15 mmol) se añadieron, la mezcla reactiva se agitó durante 2 h y se concentró posteriormente bajo presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-80:20) suministró dipéptido-doxorrubicina **34** (34 mg, 0,033 mmol, 66 %). LRMS (ESI+) calculado para C₅₀H₆₀N₆O₁₈ (*M*+H⁺) 1033,4, hallado 1032,9.

Ejemplo 9. Síntesis de conjugado BCN-doxorrubicina **35**

[0241] Dipéptido-doxorrubicina **34** (8 mg, 0,008 mmol) se disolvió en DMF (0,5 mL) y se adicionaron trifenilsilano (7 µL, 0,054 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (0,6 mg, 0,0005 mmol). Después de agitar durante toda la noche, la reacción se concentró bajo presión reducida y se suspendió en DCM (2 mL). Después de la filtración, el producto bruto se obtuvo como un sólido rojo que fue disuelto en DMF (0,5 mL). Se añadieron derivado de BCN **26** (3 mg, 0,006 mmol) y Et₃N (2 µL, 0,014 mmol) y la reacción se agitó durante toda la noche. Los solventes se extrajeron bajo presión reducida y la purificación mediante cromatografía en columna flash (DCM:MeOH 99:1-60:40) suministró conjugado BCN-doxorrubicina **35** (3 mg, 0,002 mmol, 27 %). LRMS (ESI+) calculado para C₆₈H₈₈N₈O₂₂ (*M*+H⁺) 1369,8, hallado 1369,3.

Ejemplo 9-2. Síntesis de BCN-vc-PABA-MMAE (**37a**)

[0242] A una solución de Val-Cit-PAB-MMAE.TFA (8,0 mg, 6,5 µmol) y trietilamina (3,5 µL) en DMF anhidro (1 mL) se añadió BCN-PEG₂-OSu (2,7 mg, 6,5 µmol) (**36**) como una solución en DMF (0,78 mL). El producto (6 mg, 4 µmol, 62 %) se obtuvo después de la purificación mediante HPLC de fase inversa (C18, gradiente H₂O/MeCN). LRMS (ESI+) calculado para C₇₄H₁₁₅N₁₁NaO₁₇ (*M*+Na⁺) 1452,84, hallado 1452,7.

Ejemplo 9-3. Síntesis de BCN-vc-PABA-MMAF (37b)

[0243] A una solución de Val-Cit-PAB-MMAF.TFA (17,9 mg, 14,3 μ mol) en DMF (2 mL) se añadió BCN-PEG₂-OSu (17,9 mg, 14,3 μ mol) (**36**) como una solución en DMF (0,78 mL) y trietilamina (6,0 μ L). El producto (7 mg, 5 μ mol, 35 %) se obtuvo después de la purificación mediante HPLC de fase inversa (C18, gradiente H₂O/MeCN 1 % AcOH). LRMS (HPLC, ESI+) calculado para C₇₄H₁₁₄N₁₁O₁₈ (M+H⁺) 1444,83, hallado 1445,44.

Ejemplo 9-4. Síntesis de BCN-MMAF (38)

[0244] A una solución de Val-Cit-PABA-MMAF (7,6 mg, 0,0074 mmol) en DMF (0,2 mL) se añadió éster de BCN-OSu **26** (8 mg, 0,015 mmol) y Et₃N (3 μ L, 2,2 mg, 0,022 mmol). Después de reaccionar durante toda la noche, la mezcla se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (MeOH/DCM 1/3) produjo el producto deseado (3,4 mg, 0,0022 mmol, 29 %). LRMS (HPLC, ESI+) calculado para C₈₀H₁₂₅N₁₂O₁₉ (M+H⁺) 1557,92, hallado 1558,16.

Ejemplo 9-5. Síntesis de BCN-vc-PABA-maitansinoide (39)

[0245] A una suspensión de Val-Cit-PABA- β -alaninoil-maitansinoide (disponible comercialmente de Concortis) (27 mg, 0,022 mmol) en MeCN (2 mL) se añadió trietilamina (9,2 μ L, 6,7 mg, 0,066 mmol) y una solución de carbonato BCN-PEG₂ OSu (9,2 mg, 0,022 mmol) en MeCN (1 mL). Después de 23 h, la mezcla se vertió fuera en una mezcla de EtOAc (20 mL) y agua (20 mL). Después de la separación, la fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró. Después de la purificación mediante cromatografía en columna (EtOAc \rightarrow MeOH/EtOAc 1/4) 22 mg (0,015 mmol, 70 %) del producto deseado se obtuvo. LRMS (ESI+) calculado para C₇₀H₉₇ClN₁₀O₂₀ (M+H⁺) 1432,66, hallado 1434,64.

Ejemplo 9-6. Síntesis de maleimida-vc-PABA-maitansinoide (40) [comparativa]

[0246] A una solución de Val-Cit-PABA- β -alaninoil-maitansinoide (13,9 mg, 0,011 mmol) (disponible comercialmente de Concortis, San Diego, EE.UU.) en DMF anhidro (1 mL) se añadió trietilamina (4,5 μ L, 3,3 mg, 0,033 mmol) y N-succinimidilo 6-maleimidocaproato (3,9 mg, 0,013 mmol). Después de la agitación durante un tiempo apropiado, la mezcla se dividió sobre EtOAc (20 mL) y NaHCO₃ saturado acuoso (10 mL). Después de la separación, la capa acuosa se extrajo con EtOAc (20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. Después de la purificación mediante HPLC de fase inversa (C18, gradiente H₂O/MeCN), se obtuvo 10 mg (0,0077 mmol) del producto deseado. LRMS (HPLC, ESI+) calculado para C₆₄H₈₈ClN₁₀O₁₈ (M+H⁺) 1390,60, hallado 1390,52.

[0247] Los ejemplos anteriores de 9-3 a 9-6 se representan esquemáticamente en el esquema 10a.

Ejemplo 9-7. Síntesis de DIBAC-vc-PABA-MMAF 41 (representado esquemáticamente en el esquema 11)

[0248] DIBAC-amina **29**, disponible comercialmente de ClickChemistryTools (430 mg, 1,50 mmol) se disolvió en DCM (15 mL) y se trató con anhídrido de ácido glutárico (213 mg, 1,87 mmol) y Et₃N (647 μ L, 4,67 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 2 h, seguido de la adición de DSC (478 mg, 1,87 mmol). Después de otras 2 h de agitación a temperatura ambiente, se añadió DCM (30 mL) y la reacción se lavó con H₂O (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el solvente se extrajo bajo presión reducida. La cromatografía flash (0:100-2:98 EtOAc:MeOH) suministró el éster de DIBAC-OSu (368 mg, 0,75 mmol, 48 %).

[0249] A continuación, a una solución del éster de DIBAC-OSu (1 mg, 0,003 mmol) en DMF (0,2 mL) se añadió vc-PABA-MMAF (2 mg, 0,002 mmol) y trietilamina (1 μ L, 0,007 mmol). La solución se agitó durante toda la noche seguido de concentración. La purificación con HPLC (fase invertida, MeCN:H₂O + 0,1 % TFA) dio **41** (0,9 mg, 0,0006 mmol, 33 %). El análisis LCMS dio un valor máximo con masa 1510,40 (previsto para C₈₁H₁₁₃N₁₂O₁₆ = 1510,83).

Ejemplos 9-8 - 9-11. Protocolo general para síntesis de otros doxorubicina-ciclooctinos

[0250] A una solución de 0,1 M del ciclooctino activado (1-2 equiv) en DCM/DMF (1:1) se añadió doxorubicina HCl (**27,1** equiv) y trietilamina (1,5 equiv). La solución roja se agitó durante toda la noche seguido de concentración *in vacuo*. La mezcla en bruto se preempaquetó en sílice usando DMF como solvente seguido de cromatografía en columna (DCM \rightarrow DCM:MeOH 8:2) para producir el producto deseado.

Ejemplo 9-9. Síntesis de doxorubicina-MFCO 42.

[0251] El éster de MFCO-OSu (disponible comercialmente de Berry and Associates, Dexter, Michigan, EE.UU.) (3,4 mg, 0,009 mmol) se reaccionó con Doxorubicina HCl (**27,5** mg, 0,009 mmol) según el procedimiento general para producir doxorubicina MCFO **42** (5 mg, 0,006 mmol, 69 %). El análisis LCMS dio un valor máximo con masa 831,88 (previsto para C₄₂H₄₉FN₂NaO₁₃ = 831,31).

Ejemplo 9-10. Síntesis de doxorubicina-ciclooctino 43.

[0252] Ciclooct-4-in-1-ol (Chem. Ber. 1986, 119, 297-312.) se convirtió en su derivado de carbonato de p-nitrofenilo (5 mg, 0,017 mmol), que se reaccionó con doxorubicina-HCl (**27,5** mg, 0,009 mmol) según el procedimiento general para suministrar doxorubicina-ciclooctino **43** (6 mg, 0,008 mmol, 94 %).

Ejemplo 9-11. Síntesis de doxorubicina-DIBO 44

[0253] Según el procedimiento general, carbonato DIBO OSu (disponible comercialmente de LifeTechnologies, 5 mg, 0,013 mmol) se reaccionó con doxorubicina (**27,5** mg, 0,009 mmol) para suministrar DIBO-doxorubicina **44** (7 mg, 0,008 mmol, 90 %).

[0254] Los ejemplos anteriores de 9-8 a 9-11 se representan esquemáticamente en el esquema 12.

Ejemplo 9-12. Síntesis de alquino-biotina 45 [comparativa]

[0255] A una solución de biotina-PEG₃-NH₂ en diclorometano (6 mL) se añadió trietilamina (54 µL, 39 mg, 0,39 mmol) y éster succinimidílico de ácido pent-4-inoico (25 mg, 0,13 mmol). Después de 19 h, la mezcla reactiva se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (5→20 % MeOH en DCM). El producto purificado se disolvió en DCM, se filtró y se concentró, lo que produjo el producto deseado como un sólido blanco (52 mg, 0,11 mmol, 85 %).

Ejemplo 9-13. Síntesis de biotina de hidroxilamina de O-alquilo 47

[0256] A una solución de dietilenglicol (0,89 mL, 1g, 9,42 mmol) en 80 mL de THF seco se añadió PPh₃ (5,43 g, 20,7 mmol) y N-hidroxifitalimida. Tras el enfriamiento a 0 °C, un 40 % de solución DEAD en tolueno se añadió (9,44 mL, 20,7 mmol). La mezcla se agitó durante 21 h. El producto se filtró y se lavó con EtOAc. El producto se obtuvo como un sólido blanco (1,73 g, 4,37 g). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,85 - 7,66 (m, 8H), 4,31 - 4,20 (m, 4H), 3,92 - 3,78 (m, 4H).

[0257] A continuación, 1,5 g (3,78 mmol) del producto obtenido en el paso precedente se disolvieron en 7 N NH₃ en MeOH, calentado a 40 °C y agitado durante 20 h. Se enfrió entonces a temperatura ambiente mientras se burbujeaba argón a través de la mezcla reactiva. La mezcla reactiva se concentró y el residuo se disolvió en DCM (50 mL), se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (2→5 % MeOH en DCM). Rendimiento: 0,46 g (3,38 mmol, 89 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,51 (s, 4H), 3,88-3,82 (m, 4H), 3,71-3,64 (m, 4H).

[0258] Los ejemplos anteriores 9-12 y 9-13 se representan esquemáticamente en el esquema 13.

Ejemplos 9-14 - 9.17: Síntesis de derivados de UDP-GalNAc 52-55

[0259] El esquema de reacción de la síntesis de derivados de UDP-GalNAc **52-54**, a partir de **51**, se muestra en la figura 14. Los compuestos **55** y **56** se compraron en Glycohub, Inc. (EE. UU.).

Ejemplo 9-14. Síntesis de UDP-GalNH₂ 51

[0260] El compuesto **48** se preparó a partir de D-galactosamina según el procedimiento descrito para D-glucosamina en Linhardt *et al.*, J. Org. Chem. 2012, 77, 1449-1456.

[0261] ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5,69 (dd, J = 6,84, 6,84 Hz, 1H), 5,43-5,41 (m, 1H), 5,35 (dd, J = 10,9, 3,4 Hz, 1H), 4,54 (t, J = 6,48 Hz, 1H), 4,23-4,12 (m, 1H), 4,04 (dd, J = 10,9, 6,1 Hz, 1H), 3,82 (dt, J = 11,1, 2,7 Hz, 1H), 2,12 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,99 (s, 3H). LRMS (ESI-) calculado para C₁₂H₁₈N₃O₁₁ (M-H⁺) 410,06, hallado 410,1.

[0262] A continuación, se acopló el compuesto **48** a UMP según Baisch *et al.* Bioorg. Med. Chem., 1997, 5, 383-391).

[0263] Por lo tanto, una solución de D-uridina-5'-monofosfato sal disódica (1,49 g, 4,05 mmol) en H₂O (15 mL) se trató con DOWEX 50Wx8 (forma H⁺) durante 30 minutos y se filtró. El filtrado se agitó enérgicamente a temperatura ambiente mientras se añadía tributilamina (0,966 mL, 4,05 mmol) gota a gota. Después de 30 minutos de agitación adicional, la mezcla reactiva se liofilizó y se secó adicionalmente sobre P₂O₅ bajo vacío durante 5 h.

[0264] El uridina-5'-monofosfato de tributilamonio resultante se disolvió en DMF seco (25 mL) en una atmósfera de argón. Se añadió carbonildiimidazol (1,38 g, 8,51 mmol) y la mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se añadió MeOH seco (180 µL) y se agitó durante 15 min para eliminar el exceso de CDI. El MeOH sobrante se extrajo bajo alto vacío durante 15 min. Posteriormente, el compuesto **48** (2,0 g, 4,86 mmol) se disolvió en DMF seco (25 mL) y se añadió gota a gota a la mezcla reactiva. Se permitió la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 2 d antes de la concentración *in vacuo*. El consumo del intermedio de imidazol-UMP se controló con MS. La cromatografía en columna flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H₂O) suministró producto **49** (1,08 g, 1,51 mmol, 37 %). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ 7,96 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,98-5,94 (m, 2H), 5,81-5,79 (m, 1H), 5,70 (dd, *J* = 7,1, 3,3 Hz, 1H), 5,49 (dd, *J* = 15,2, 2,6 Hz, 1H), 5,30 (ddd, *J* = 18,5, 11,0, 3,2 Hz, 2H), 4,57 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H), 4,35-4,16 (m, 9H), 4,07-3,95 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,07 (s, 3H).

[0265] LRMS (ESI-) calculado para C₂₁H₂₉N₅O₁₉P₂ (*M*-H⁺) 716,09, hallado 716,3.

[0266] El compuesto **49** se desacetiló según Kiso *et al.*, Glycoconj. J., 2006, 23, 565-573).

[0267] Por lo tanto, el compuesto **49** (222 mg, 0,309 mmol) se disolvió en H₂O (2,5 mL) y trietilamina (2,5 mL) y MeOH (6 mL) se añadieron. La mezcla reactiva se agitó durante 3 h y luego se concentró *in vacuo* para suministrar UDP-2-azido-2-deoxi-D-galactosa en bruto (**50**). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ 7,99 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,02-5,98 (m, 2H), 5,73 (dd, *J* = 7,4, 3,4 Hz, 1H), 4,42-4,37 (m, 2H), 4,30-4,18 (m, 4H), 4,14-4,04 (m, 2H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,65-3,58 (m, 1H). LRMS (ESI-) calculado para C₁₅H₂₃N₅O₁₆P₂ (*M*-H⁺) 590,05, hallado 590,2.

[0268] Finalmente, a una solución de compuesto **50** en H₂O:MeOH 1:1 (4 mL) se añadió catalizador Lindlar (50 mg). La reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 5 h y se filtró sobre celita. El filtro se enjuagó con H₂O (10 mL) y el filtrado se concentró *in vacuo* para suministrar la UDP-D-galactosamina (UDP-GalNH₂, **51**) (169 mg, 0,286 mmol, 92 % rendimiento después de dos pasos). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ 7,93 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,99-5,90 (m, 2H), 5,76-5,69 (m, 1H), 4,39-4,34 (m, 2H), 4,31-4,17 (m, 5H), 4,05-4,01 (m, 1H), 3,94-3,86 (m, 1H), 3,82-3,70 (m, 3H), 3,30-3,16 (m, 1H). LRMS (ESI-) calculado para C₁₅H₂₅N₃O₁₆P₂ (*M*-H⁺) 564,06, hallado 564,1.

Ejemplo 9-15. Síntesis de UDP-GalNAz **52**

[0269] El éster succinimidílico de ácido azidoacético se preparó según el procedimiento descrito en Hamilton *et al.*, Chem. Eur. J., 2012, 18, 2361-2365.

[0270] La UDP-D-galactosamina (**51**) (82 mg, 0,145 mmol) se disolvió en 0,1 M de NaHCO₃ (2 mL) y éster succinimidílico de ácido azidoacético (86 mg, 0,435 mmol) y DMF (2 mL) se añadieron. La reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y se concentró posteriormente *in vacuo*. La cromatografía en columna flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H₂O) suministró UDP-GalNAz (**52**) (34 mg, 0,052 mmol, 36 %).

[0271] ¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ 8,73 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,90-5,82 (m, 2H), 5,49 (dd, *J* = 6,9, 3,3 Hz, 1H), 4,29-4,05 (m, 7H), 4,03-3,85 (m, 4H), 3,72-3,61 (m, 2H).

[0272] LRMS (ESI-) calculado para C₁₇H₂₆N₆O₁₇P₂ (*M*-H⁺) 647,08, hallado 647,1.

Ejemplo 9-16. Síntesis de UDP-GalNAc-ina **53** [comparativa]

[0273] El éster succinimidílico de ácido pent-4-inoico se preparó según el procedimiento descrito en Rademann *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, 9441-9447.

[0274] UDP-D-galactosamina (**51**) (53 mg, 0,094 mmol) se disolvió en 0,1 M de NaHCO₃ (2 mL) y éster succinimidílico de ácido pent-4-inoico (37 mg, 0,188 mmol) y DMF (2 mL) se añadieron. La reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y se concentró *in vacuo*. La cromatografía en columna flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H₂O) suministró UDP-GalNAc-ina (**53**) (42 mg, 0,065 mmol, 69 %).

[0275] ¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ 7,78 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,84-5,76 (m, 2H), 5,39 (dd, *J* = 6,8, 3,2 Hz, 1H), 4,22-4,16 (m, 2H), 4,14-3,97 (m, 5H), 3,88-3,85 (m, 1H), 3,81-3,75 (m, 1H), 3,63-3,55 (m, 2H), 2,45-2,28 (m, 5H), 2,19 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H).

[0276] LRMS (ESI-) calculado para C₂₀H₂₉N₃O₁₇P₂ (*M*-H⁺) 644,09, hallado 644,1.

Ejemplo 9-17. Síntesis de UDP-GalNLev 54 [comparativa]

[0277] El éster succinimidílico de ácido levulínico se preparó según el procedimiento para éster succinimidílico de ácido pent-4-inoico descrito en Rademann *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, 9441-9447.

[0278] ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 2,81 (s, 4H), 2,77 (s, 4H), 2,14 (s, 3H).

[0279] UDP-D-galactosamina (**51**) (53 mg, 0,094 mmol) se disolvió en 0,1 M de NaHCO₃ (2 mL) y éster succinimidílico de ácido levulínico (40 mg, 0,188 mmol) y DMF (2 mL) se añadieron. La reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y el solvente se extrajo bajo presión reducida. La cromatografía en columna flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H₂O) suministró UDP-GalNLev (**54**) (10 mg, 0,015 mmol, 16 %).

[0280] ¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ 7,78 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,82-5,77 (m, 2H), 5,36 (dd, J = 6,8, 3,2 Hz, 1H), 4,22-4,15 (m, 2H), 4,13-3,95 (m, 5H), 3,88-3,84 (m, 1H), 3,82-3,75 (m, 1H), 3,64-3,52 (m, 3H), 2,74-2,61 (m, 2H), 2,47-2,37 (m, 2H), 2,05 (s, 3H).

[0281] LRMS (ESI-) calculado para C₂₀H₃₁N₃O₁₈P₂ (M-H⁺) 662,10, hallado 662,1.

Ejemplo 9-18. Síntesis de BCN-MMAF (56)

[0282] A una solución de MMAF.TFA (8,1 mg, 0,0096 mmol) en DMF (0,3 mL) se añadió Et₃N (5 µL, 3,6 mg, 0,036 mmol) y BCN-PEG₂-OSu (**36**) (19 mg, 0,045 mmol). Después de reaccionar durante toda la noche, la mezcla se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna (DCM → MeOH/DCM 1/3) produjo el producto deseado. LRMS (HPLC; ESI+) calculado para C₅₅H₈₇N₆O₁₃ (M+H⁺) 1039,63, hallado 1039,72.

Protocolo general para modificación de IgG*Recorte de glicanos IgG con endo S*

[0283] El recorte de glicanos IgG se realizó utilizando endo S de *Streptococcus pyogenes* (disponible comercialmente de Genovis, Lund, Suecia). El IgG (10 mg/mL) se incubó con endo S (40 U/mL) en 25 mM Tris pH 8,0 durante aproximadamente 16 horas a 37 °C. El IgG desglucosilado se concentró y se lavó con 10 mM de MnCl₂ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 utilizando una membrana Amicon Ultra-0,5, Ultracel-10 (Millipore).

Análisis de espectros de masas

[0284] Una solución de 50 µg de IgG (modificado), 1 M de Tris-HCl con pH 8,0, 1 mM de EDTA y 30 mM de DTT con un volumen total de aproximadamente 70 µL se incubó durante 20 minutos a 37 °C para reducir los puentes disulfuro que permiten analizar las cadenas tanto ligeras como pesadas. Si están presentes, las funcionalidades de azida se reducen a aminas bajo estas condiciones. Muestras reducidas se lavaron tres veces con milliQ utilizando membrana Amicon Ultra-0,5, Ultracel-10 (Millipore) y se concentraron a 10 µM de IgG (modificado). El IgG reducido se analizó por tiempo de vuelo con ionización por electrospray (ESI-TOF) en un JEOL AccuTOF. Los espectros desconvolucionados se obtuvieron utilizando software Magtran.

Ejemplo 10. Recorte de trastuzumab (figura 15a + 15b)

[0285] Se sometió trastuzumab al protocolo de recorte anterior. Después de la desconvolución de los valores máximos, el espectro de masas mostró un valor máximo de la cadena ligera y dos valores máximos de la cadena pesada. Los dos valores máximos de la cadena pesada pertenecían a un producto principal (49496 Da, 90 % de cadena pesada total), resultante de trastuzumab sustituido con GlNAc(Fuc) central, y un producto menor (49351 Da, ± 10 % de cadena pesada total), resultante de trastuzumab sustituido con GlcNac central.

Ejemplo 11. Recorte de bevacizumab

[0286] El tratamiento del bevacizumab similar al del trastuzumab llevó a la formación de un producto de cadena pesada principal (50062 Da, ± 90 %) junto con unos pocos productos de cadena pesada menor (± 10 %).

Ejemplo 12. Recorte de cetuximab

[0287] El cetuximab difiere del trastuzumab en el hecho de que contiene un segundo sitio de N-glicosilación en N88. El glicano en N88 se localiza en la región Fab y tiene una constitución diferente del glicano en N297. El tratamiento del cetuximab similar al trastuzumab llevó a la formación de un rango de productos de cadena pesada con masas de 51600 Da-52300 Da (valores máximos en 51663 Da y 51808 Da), lo que indica que solo se recortó un glicano por Endo S, supuestamente en N297.

Ejemplo 12-1. Recorte de rituximab

[0288] El tratamiento del rituximab similar al trastuzumab llevó a la formación de un producto de cadena pesada principal (49408 Da).

Ejemplo 12-2. Intento de recorte de trastuzumab con endo H

[0289] El trastuzumab se incubó con endoglicosidasa H (EndoH) de *Streptomyces picatus* (disponible comercialmente de New England BioLabs). Se añadieron concentraciones en aumento de endo H (≤ 115 u/ μ L) a trastuzumab (10 mg/mL) en 50 mM de citrato sódico con pH 5,5 y se incubaron durante 16 h a 37 °C. Los espectros de masas solo mostraron los principales valores máximos correspondientes a la cadena pesada glicosilada nativa (50589 y 50752 Da que corresponden a las isoformas G0F y G1F, respectivamente), lo que indica que el trastuzumab no se puede recortar usando endo H.

Ejemplo 12-3. Intento de recorte de trastuzumab con endo M

[0290] El trastuzumab (10 mg/mL) se incubó con concentraciones en aumento de endo- β -N-acetilglucosaminidasa (endo M, ≤ 231 mU/mL) de *Mucor hiemalis* (disponible comercialmente de TCI Europe N.V.) en 50 mM de citrato sódico con pH 6,0 y se incubó durante 16 h a 37 °C. Los espectros de masas mostraron los principales valores máximos correspondientes a la cadena pesada glicosilada nativa (50589 y 50752 Da que corresponden a las isoformas G0F y G1F, respectivamente). Además, se observó un producto menor (49347 Da, ± 5 % de la cadena pesada total), resultante de la cadena pesada sustituida con GlcNAc central. Estos resultados muestran que solo las glicofomas de trastuzumab que carecen de la fucosa central pueden recortarse con endo M.

Glicosiltransferencia de derivado de galactosa (por ejemplo, azidoazúcar) con Gal-T1(Y289L)

[0291] La introducción enzimática de derivado de galactosa (por ejemplo azúcar que contiene azida) en IgG se efectuó con un mutante de $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa [$\beta(1,4)$ -Gal-T1(Y289L)] bovina. El IgG desglicosilado (preparado como se ha descrito anteriormente, 10 mg/mL) se incubó con un derivado de UDP-galactosa modificado (por ejemplo, un derivado UDP de azúcar modificado con azida) (0,4 mM) y $\beta(1,4)$ -Gal-T1(Y289L) (1 mg/mL) en 10 mM de $MnCl_2$ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C.

[0292] El IgG funcionalizado (por ejemplo, IgG funcionalizado con azida) se incubó con proteína A agarosa (40 μ L por mg de IgG) durante 2 horas a 4 °C. La proteína A agarosa se lavó tres veces con PBS y el IgG se eluyó con 100 mM de glicina-HCl con pH 2,7. El IgG eluido se neutralizó con 1 M de Tris-HCl con pH 8,0 y se concentró y se lavó con PBS utilizando una membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore) hasta una concentración de 15-20 mg/mL.

Ejemplo 13. Trastuzumab(GalNAz)₂ (figura 15c)

[0293] El trastuzumab se sometió al protocolo de glicosiltransferencia con UDP-N-azidoacetilgalactosamina 52 (UDP-GalNAz). Después de la purificación de afinidad de la proteína A, el análisis de espectros de masas indicó la formación de un producto principal de (49713 Da, 90 % de la cadena pesada total), resultante de la transferencia de GalNAz al trastuzumab sustituido con GlcNAc(Fuc) central, y un producto menor (49566 Da, ± 10 % de la cadena pesada total), resultante de la transferencia de GalNAz al trastuzumab sustituido con GlcNAc central.

Ejemplo 14. Bevacizumab(GalNAz)₂

[0294] El bevacizumab (7,5 mg, 10 mg/mL) se recortó con Endo S según el protocolo general. El bevacizumab recortado (10 mg/mL) se incubó con UDP-GalNAz 52 (65 μ L, 10 mM) y $\beta(1,4)$ -GalT1(Y289L) (75 μ L, 2 mg/mL) en 10 mM de $MnCl_2$ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C. La purificación con ProtA dio el bevacizumab modificado (3,2 mg). El análisis AccuTOF mostró la formación de un producto de cadena pesada principal (50282 Da, ± 95 %).

Ejemplo 15. Cetuximab(GalNAz)₂

[0295] Cetuximab (7,5 mg, 10mg/mL) se recortó con endo S según el protocolo general. El cetuximab recortado (10 mg/mL) se incubó con UDP-GalNAz 52 (65 μ L, 10 mM) y $\beta(1,4)$ -GalT1(Y289L) (75 μ L, 2 mg/mL) en 10 mM de $MnCl_2$ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C. La purificación con ProtA dio el cetuximab modificado (3,2 mg). El análisis AccuTOF mostró la formación de dos productos de cadena pesada principales (51884 Da y 52029 Da), según el recorte del glicano N297, pero no del glicano Fab.

Ejemplo 15-1. Rituximab(GalNAz)₂

[0296] El rituximab (7,5 mg, 10mg/mL) se recortó con Endo S según el protocolo general. El rituximab recortado (10 mg/mL) se incubó con UDP-GalNAz 52 (65 µL, 10 mM) y β(1,4)-GalT1(Y289L) (75 µL, 2 mg/mL) en 10 mM de MnCl₂ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C. La purificación con ProtA dio el Rituximab modificado (3,2 mg). El análisis AccuTOF mostró la conversión completa al producto deseado (masa 49625, masa prevista 49627).

Ejemplo 15-2. Girentuximab(GalNAz)₂

[0297] El girentuximab se recortó utilizando endo S según el protocolo general anteriormente descrito, lo que condujo a la formación de un producto de cadena pesada principal (49427 Da). El girentuximab recortado se incubó posteriormente con UDP-GalNAz y β(1,4)-Gal-T1(Y289L) como se ha descrito anteriormente, lo que llevó a la formación de un producto de cadena pesada principal (49643 Da).

Ejemplo 15-3. Trastuzumab(GalNAc-ina)₂ [comparativo]

[0298] El trastuzumab recortado (100 µL, 10 mg/mL, 6,6 nmol), obtenido mediante el tratamiento con endo S del trastuzumab según el protocolo general, se incubó con UDP-GalNAc-ina (**53**) (5 µL, 10 mM) y β(1,4)-Gal-T1(Y289L) (5 µL, 2 mg/mL) en 10 mM de MnCl₂ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C. La mezcla en bruto se purificó con ProtA para suministrar trast-(GalNAc-ina)₂ (0,43 mg). El análisis AccuTOF mostró 90 % de conversión al producto deseado (masa 49735, masa prevista 49736), se observó 10 % de subproducto (masa 50379).

Ejemplo 15-4. Trastuzumab(GalNLev)₂ [comparativo]

[0299] El trastuzumab recortado (100 µL, 10 mg/mL, 6,6 nmol), obtenido mediante el tratamiento con endo S del trastuzumab según el protocolo general, se incubó con UDP-GalNLev (**54**) (10 µL, 10 mM) y β(1,4)-Gal-T1(Y289L) (7,5 µL, 2 mg/mL) en 10 mM de MnCl₂ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C. La mezcla en bruto se purificó con ProtA para dar trast-(GalNLev)₂ (0,53 mg). El análisis AccuTOF mostró 95 % de conversión al producto deseado (masa 49753, masa prevista 49754), se observó 5 % de subproducto (masa 50417).

Recorte de transferencia de + GalNAz a IgG de plasma agrupado.*Ejemplo 15-5. Análisis espectrométrico de masa de IgG de plasma*

[0300] A la mezcla reactiva que contiene 0,5 mg de IgG de plasma agrupado (Lee Biosolutions, Inc) se añadió PBS (220 µL) y tampón de digestión (250 µL, 0,1 mg/mL de papaína, 0,02 M de cisteína, 0,02 M de EDTA en PBS) seguido de incubación durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se añadió lechada de proteína A (100 µL) y se rotó la mezcla sucesivamente durante 1 h. La proteína A se lavó con PBS (3 × 1 mL) seguido de elución con tampón de Glicina-HCl (pH 2,7, 0,1 M, 300 µL). El tampón de elución se neutralizó con Tris-HCl (pH 8, 0,1 M, 80 µL) y posteriormente se tomó una muestra para el análisis de masa según el protocolo estándar (figura 14a).

Ejemplo 15-6. Recorte de IgG de plasma agrupado

[0301] El plasma agrupado IgG (170 µL, 14 mg/mL) se recortó con endo S (16 µL, 20 u/µl) en 98 µL de Tris-HCl (25 mM, pH 8,0) durante 16 horas a 37 °C. El análisis se realizó según el protocolo de análisis. Las mediciones del AccuTOF mostraron conversión completa.

[0302] Los ejemplos anteriores 15-5 y 15-6 se representan esquemáticamente en el esquema 16.

Ejemplo 15-7. Transferencia de GalNAz a IgG de plasma.

[0303] El IgG de plasma recortado (46 µL, 10,8 mg/mL, 3,3 nmol) se incubó con UDP-GalNAz 52 (3,3 µL, 10 mM) y β1,4-Gal-T1(Y289L) (2,5 µL, 2 mg/mL) en 10 mM de MnCl₂ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C. El análisis se realizó según el protocolo de análisis de IgG del plasma y las mediciones del AccuTOF mostraron conversión completa.

Conjugación de IgG modificado con azida mediante cicloadición con una sonda de ciclooctino

[0304] Una molécula enlazada de manera covalente con BCN o funcionalizada con DIBAC (en DMSO) se diluyó en PBS. El IgG purificado que contiene azidas (100 µL de 10 mg/mL) se añadió y la mezcla reactiva se rotó sucesivamente durante de 12 a 72 horas a 4 °C. El conjugado de IgG resultante se concentró y se lavó con PBS utilizando a membrana Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 (Millipore) hasta una concentración final de 10 mg/mL.

Reacciones de conjugación del IgG modificado con azida mediante cicloadición promovida por tensión con una sonda de ciclooctino

[0305] Después de la purificación de la proteína A, el IgG que contiene azida (100 µM o 15 mg/mL) se añadió a 0,01 de volumen de 40 mM de una solución madre de una molécula funcionalizada con ciclooctino enlazada de manera covalente (4 equivalentes) en DMSO o DMF, se mezcló inmediatamente y se rotó sucesivamente durante de 12 a 24 horas a temperatura ambiente. Si era necesario, este procedimiento se repitió para obtener la conversión completa. El conjugado de IgG resultante se concentró y se lavó con PBS utilizando una membrana Amicon Ultra-0,5, Ultracel-10 (Millipore) hasta una concentración final de 10 mg/mL.

[0306] En el caso del ADC, este paso se sustituyó mediante purificación mediante cromatografía de exclusión de tamaño en una columna Superdex200.

Ejemplo 16. Conjugación de BCN-biotina a trastuzumab(GalNAz)₂

[0307] El conjugado de BCN-biotina **25** (2 µL 100 mM en DMSO) se diluyó en PBS (98 µL) y 5 µL de esta solución se sometieron a trastuzumab(GalNAz)₂ (5 µL 10 mg/ml en PBS). El lavado y la concentración, seguidos de análisis de espectros de masas indicaron la presencia de un producto principal (50294 Da, 90 % de la cadena pesada total) y un producto menor (50148 Da, ± 10 % de la cadena pesada total).

Ejemplo 17. Conjugación de DIBAC-biotina a trastuzumab(GalNAz)₂

[0308] El conjugado DIBAC-biotina **30** (2 µL 100 mM en DMSO) se diluyó en PBS (98 µL) y 5 µL de esta solución se sometieron a trastuzumab(GalNAz)₂ (5 µL 10 mg/ml en PBS). El lavado y la concentración, seguidos de análisis de espectros de masas, indicaron la presencia de un producto principal (50247 Da, 90 % de la cadena pesada total) y un producto menor (50101 Da, ± 10 % de la cadena pesada total).

*Ejemplo 17-1. Conjugación de DIBAC-vc-PABA-MMAF **41** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0309] Después de 1 día, según análisis AccuTOF, conversión completa. Masa observada 51248, masa prevista 51248.

*Ejemplo 18. Conjugación de BCN-doxorrubicina **28a** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0310] La BCN-doxorrubicina **28a** (4 µL de 50 mM de solución en DMSO) se diluyó en PBS (896 µL) y se sometió a trastuzumab(GalNAz)₂ como se describe en el procedimiento general. El lavado y la concentración, seguidos de análisis de espectros de masas indicaron la presencia de un producto principal (50708 Da, 90 % de la cadena pesada total) y un producto menor (50294 Da, ± 10 % de la cadena pesada total).

*Ejemplo 19. Conjugación de BCN-doxorrubicina **35** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0311] La BCN-doxorrubicina **35** (4 µL 50 mM en DMSO) se diluyó en PBS (896 µL) y se sometió a trastuzumab(GalNAz)₂ como se describe en el procedimiento general. El lavado y la concentración, seguidos de análisis de espectros de masas indicaron la presencia del conjugado de trastuzumab(GalNAz)₂ y BCN-doxorrubicina **35** (51114 Da).

*Ejemplo 20. Conjugación de BCN-PEG₈-doxorubicina **28b** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0312] La incubación de BCN-PEG₈-doxorubicina (400 µM, 4 eq) con trastuzumab(GalNAz)₂ (100 µM) en PBS durante 16 h llevó a una conversión completa en trastuzumab(PEG₈-doxorubicina)₂ (productos de cadena pesada entre 50467 y 51134 Da con valor máximo mayor de 50881 Da que corresponde a la cadena pesada con GalNAzGlcNac(Fuc) central conjugada a BCN-PEG₈-doxorubicina).

*Conjugación de BCN-vc-PABA-doxorrubicina **33** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0313] La BCN-doxorrubicina **33** (4 µL de 50 mM solución en DMSO) se diluyó en PBS (896 µL) y se sometió a trastuzumab(GalNAz)₂ como se describe en el procedimiento general. El lavado y la concentración, seguidos de análisis de espectros de masas indicaron la presencia del conjugado de trastuzumab(GalNAz)₂ y BCN-vc-PABA-doxorrubicina **33** (51114 Da).

*Ejemplo 22. Conjugación de BCN-vc-PABA-MMAE **37a** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0314] La incubación de BCN-vc-PABA-MMAE **37a** (125 µM, 5 eq) con trastuzumab(GalNAz)₂ (25 µM) en PBS durante 16 h llevó a una conversión completa en trastuzumab(vc-PABA-MMAE)₂ (productos de cadena pesada entre 51137 y 51600 Da con valor máximo principal de 51283 Da que corresponde a cadena pesada con GalNAzGlcNac(Fuc) central conjugada a BCN-vc-MMAE, ± 95 % de cadena pesada total, y un valor máximo menor de 50520 Da debido a la fragmentación del enlazador de PABA durante la espectrometría de masas, ± 5 % de cadena pesada total).

*Ejemplo 23. Conjugación de BCN-vc-PABA-MMAF **37b** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0315] La incubación de BCN-vc-PABA-MMAF **37b** (600 µM, 4 + 2 eq) con trastuzumab(GalNAz)₂ (100 µM) en PBS durante aproximadamente 16 h llevó a una conversión completa en trastuzumab(vc-PABA-MMAF)₂ (productos de cadena pesada entre 51032 y 51500 Da con valor máximo principal de 51181 Da que corresponde a la cadena pesada con GalNAzGlcNac(Fuc) central conjugada a BCN-vc-PABA-MMAF, ± 95 % de la cadena pesada total, y un valor máximo menor a 50407 Da debido a la fragmentación del enlazador de PABA durante la espectrometría de masas, ± 5 % de la cadena pesada total).

*Ejemplo 24. Conjugación de BCN-MMAF **38** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0316] Trastuzumab(MMAF)₂: incubación de BCN-MMAF **38** con trastuzumab(GalNAz)₂ (100 µM) en PBS durante aproximadamente 16 h llevó a una conversión completa en trastuzumab(MMAF)₂ (productos de cadena pesada entre 50636 y 51100 Da con valor máximo principal de 50783 Da que corresponde con la cadena pesada con GalNAzGlcNac(Fuc) central conjugada a BCN-MMAF).

*Ejemplo 24-2. Conjugación de BCN-MMAF **57** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0317] Trastuzumab(MMAF)₂: la incubación de BCN-MMAF (**57**, figura 10b) con trastuzumab(GalNAz)₂ (100 µM) en PBS durante aproximadamente 16 h llevó a una conversión completa en trastuzumab(MMAF)₂ (productos de cadena pesada entre 50636 y 51100 Da con valor máximo mayor de 50783 Da que corresponde con la cadena pesada con GalNAzGlcNac(Fuc) central conjugada a BCN-MMAF **57**).

*Ejemplo 25. Conjugación de BCN-vc-PABA-maitansinoide **39** a trastuzumab(GalNAz)₂*

[0318] La incubación de BCN-vc-PABA-maitansinoide (**39**) (800 µM, 2 x 4 eq) con trastuzumab(GalNAz)₂ (100 µM) en PBS durante aproximadamente 40 h llevó a una conversión completa en trastuzumab(vc-PABA-maitansinoide)₂ (productos de cadena pesada entre 50781 y 51600 Da con valor máximo principal de 51172 Da que corresponde a la cadena pesada con GalNAzGlcNac(Fuc) central conjugada a BCN-vc-PABA-maitansinoide, ± 95 % de cadena pesada total).

*Conjugación de conjugados ciclooctino-doxorrubicina **42-44** a trastuzumab(GalNAz)₂ mediante cicloadición promovida por tensión*

[0319] A una solución de trastuzumab-(GalNAz)₂ (7,5 µL, 20 mg/ml, 1 nmol) en PBS se añadió una solución de ciclooctino (2,5 µL, 2,4 mM 5 % DMF en MiliQ, 6 nmol). La reacción se rotó sucesivamente seguido de análisis AccuTOF.

*Ejemplo 26: Conjugación de MCFO-doxorrubicina **42** a trast(GalNAz)₂*

[0320] Después de 5 días, según el análisis AccuTOF, conversión del 80 %. Masa observada 50548, masa prevista 50550.

*Ejemplo 27: Conjugación de DIBO-doxorrubicina **43** a trast(GalNAz)₂*

[0321] Después de 5 días, según el análisis AccuTOF, conversión del 30 %. Masa observada 50530, masa prevista 50544.

*Ejemplo 28: Conjugación de ciclooctino-doxorrubicina **44** a trast(GalNAz)₂*

[0322] Después de 5 días, según el análisis AccuTOF, conversión del 50 %. Masa observada 50434, masa prevista 50449.

*Ejemplo 29: CuAAC de trastuzumab-(N₃)₂ con alquino-biotina **45** [comparativa]*

[0323] A una solución de trast-(GalNAz)₂ (10 µL, 9,6 mg/ml, 0,64 nmol) (derivado de **52**) en PBS se añadió una solución de alquino-biotina (**45**, 1 µL, 10 mM, 10 nmol) y una premezcla de materia prima (1 µL, 10 mM de CuSO₄, 10 mM de ascorbato sódico, 10 mM de tris((1-((O-etil)carboximetil)-(1,2,3-triazol-4-il))metilamina en 20 % de MeCN en miliQ). La reacción se rotó sucesivamente durante toda la noche, tiempo después del cual el análisis AccuTOF mostró la formación completa del producto deseado (masa observada 50195), como se indica en la figura 17.

*Ejemplo 30: CuAAC de trastuzumab-ina₂ con azida-biotina **46** [comparativa]*

[0324] A una solución de trast-(GalNAc-ina)₂ derivada de **53** (10 µL, 9,6 mg/ml, 0,64 nmol) en PBS se añadió una solución de biotina-N₃ **46** (1 µL, 10 mM, 10 nmol) y una premezcla de materia prima (1 µL, 10 mM de CuSO₄, 10 mM de ascorbato sódico, 10 mM de tris((1-((O-etil)carboximetil)-(1,2,3-triazol-4-il))metilamina en 20 % de MeCN en miliQ). La reacción se rotó sucesivamente durante toda la noche y posteriormente el análisis AccuTOF mostró conversión del 50 % (masa 50353, masa prevista 50351), como se indica en la figura 18.

*Ejemplo 31: Conjugación de maleimida-vc-PABA-maitansinoide **40** a trastuzumab(N297C) [comparativa]*

[0325] El trastuzumab(N297C) (4 mg, 10 mg/mL) se incubó con DTT (10 eq) en PBS con pH 7,4 durante 2 horas a 22 °C. El exceso de DTT se extrajo mediante purificación con filtro de centrifugado y el IgG reducido (10 mg/mL) se incubó con ácido deshidroascórbico (20 eq) durante 3 horas a 22 °C. Maleimida-vc-PABA-maitansinoide **40** (3 eq) se añadió y la mezcla reactiva se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo cual el exceso de maleimida-vc-PABA-maitansinoide **40** se extrajo mediante purificación con filtro de centrifugado. El análisis AccuTOF mostró la formación de tres productos de cadena pesada, que corresponden a la cadena pesada no modificada (49133 Da, ± 10 % de la cadena pesada total), la cadena pesada conjugada a 1 maitansinoide (50454 Da, ± 85 % de la cadena pesada total) y la cadena pesada conjugada a 2 maitansinoides (50774 Da, ± 5 % de la cadena pesada total). No se detectó conjugación a la cadena ligera.

Ejemplo 32: Ensayo de estabilidad de plasma in vitro

[0326] El plasma humano (preparado utilizando heparina) se centrifugó a 200 g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se incubó con proteína A agarosa (Kem-En-Tec) durante 1 hora a 4 °C para agotar el IgG. El plasma agotado se filtró esterilizado utilizando un filtro de 0,22 µm (Whatman). El conjugado de trastuzumab-doxorrubicina derivado de **28a** se añadió al plasma humano estéril a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó a 37 °C en una incubadora de CO₂ para mantener los niveles del pH del plasma cerca del pH fisiológico de 7,2. Las muestras se tomaron a 0, 24, 48 y 144 horas y se almacenaron a -80 °C. El conjugado de trastuzumab se purificó con proteína A agarosa seguido de análisis MS. Las muestras de plasma humano se incubaron con proteína A agarosa durante 1 hora a 4 °C, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el conjugado de trastuzumab se eluyó con 100 mM de glicina-HCl con pH 2,7 seguido de neutralización con 1 M de Tris-HCl con pH 8,0. El análisis MS mostró que el valor máximo que corresponde al conjugado de trastuzumab-doxorrubicina (50708 Da) no se redujo con el tiempo. Además, no se pudo detectar ningún valor máximo correspondiente a productos de degradación, lo que demuestra que el conjugado es estable durante al menos 144 horas en el plasma humano.

Ejemplo 33: Eficacia in vitro

[0327] Las células SK-Br-3 (Her2+), SK-OV-3 (Her2+) y MDA-MB-231 (Her2-) se colocaron en placas con placas de 96 pocillos (5000 células/pocillo) en RPMI 1640 GlutaMAX (Invitrogen) complementadas con 10 % de suero fetal de ternera (FCS) (Invitrogen, 200 µl/pocillo) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Una serie de diluciones triples (que varían de ± 0,002 a 100 nM) de los compuestos filtrados de forma estéril se prepararon en RPMI 1640 GlutaMAX complementadas con 10 % de FCS. Después de la eliminación del medio de cultivo, la serie de concentraciones se añadieron por cuadruplicado y se incubaron durante tres días a 37 °C y 5 % de CO₂. El medio de cultivo se sustituyó por 0,01 mg/mL de resazurina (Sigma Aldrich) en RPMI 1640 GlutaMAX complementado con 10 % de FCS. Después de 4 a 6 horas a 37 °C y 5 % de CO₂, se detectó fluorescencia con un lector de placa de fluorescencia (Tecan Infinite 200) a 540 nm de excitación y 590 nm de emisión. Las unidades fluorescentes relativas (RFU) se normalizaron al porcentaje de viabilidad celular mediante el ajuste de los pocillos sin células a 0 % de

viabilidad y los pocillos con la dosis más baja de compuesto a 100 % de viabilidad. Para cada condición se muestra el porcentaje de viabilidad celular media \pm eem.

[0328] La citotoxicidad *in vitro* de trastuzumab-(vc-PABA-MMAE)₂ (derivado de **37a**), trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)₂ (derivado de **37b**), trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)₂ (derivado de **39**), trastuzumab-(maitansinoide)₂ y trastuzumab(N297C)-(vc-PABA-maitansinoide)₂ (derivado de **40**) se compararon con T-DM1 como un control positivo y trastuzumab y rituximab-(vc-PABA-maitansinoide)₂ como controles negativos. Todos los ADC basados en trastuzumab afectan la viabilidad de las líneas celulares Her2 positivas SK-Br-3 y SK-OV-3, pero no de la línea celular Her2 negativa MDA-MB-231, lo que muestra que estos ADC actúan sobre las células Her2 positivas. En la línea celular Her2 negativa MDA-MB-231, solo T-DM1 muestra una reducción ligera en la viabilidad celular en la concentración más elevada (100 nM).

Ejemplo 34: Conjugación, radiomarcado y determinación de IRF de DTPA

[0329] Trastuzumab(MMAF)₂ (derivado de conjugación de trast(GalNAz)₂ y **37b**) y trastuzumab(maitansinoide)₂ (derivado de conjugación de trast(GalNAz)₂ y **39**), trastuzumab desglicosilado (obtenido de tratamiento del trastuzumab y endo S) y trastuzumab nativo se conjugaron con isotiocianato-DTPA (Macrocyclics, Houston, TX) y se marcaron con ¹¹¹In (Covidien, Petten). Para los experimentos con animales, todos los constructos se marcaron en actividad específica entre 2,7 y 3,4 MBq/μg.

Ejemplo 35: Estudios de PK/biodistribución

[0330] Los ratones sin pelo BALB/c (n=15) se inocularon subcutáneamente con células 5 x 10⁶ SK-OV-3 (volumen de inyección: 200 μl) en el flanco adecuado. 14 días después de la inducción tumoral, grupos de cinco ratones se inyectaron i.v. con 15-20 MBq de anticuerpo marcado con ¹¹¹In, marcados en una dosis de proteína de 25 μg. Para valorar la estabilidad *in vivo* y las farmacocinéticas de los conjugados, muestras de sangre de 50 μl se tomaron mediante sangrado submandibular a 0,5, 1,30 min, 1, 2 y 4 horas, y 1, 2, 5, 7, 9, 13, 16 y 21 días después de la inyección de las preparaciones de anticuerpo radiomarcadas.

Ejemplo 36: Biodistribución

[0331] Una semana después de la inyección (3 d p.i.) se sometió a los ratones a eutanasia y diseccionaron para determinar la biodistribución del radiomarcado en tejidos pertinentes. La distribución de tejido de trastuzumab(MMAF)₂ (derivado de **37b**), trastuzumab(maitansinoide)₂ (derivado de **39**) y trastuzumab desglicosilado es comparable con la del trastuzumab nativo.

Ejemplo 37: Eficacia in vivo

[0332] Los ratones SHO hembra (CrI:SHO-Prkdcscid Hrhr, de 6 a 9 semanas de edad al principio de la fase experimental, obtenidos de *Charles River Laboratoriss*, L'Arbresles, Francia) se anestesiaron con cetamina/xilazina, la piel se asepticó con una solución de clorhexidina, se hizo una incisión en el nivel de la región interescapular, se colocó un fragmento tumoral de 20 mm³ (modelo de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer de mama HBCx-13B) en el tejido subcutáneo y la piel se cerró con clips. Cuando el volumen tumoral estuvo en el rango de 60 a 200 mm³, grupos de cuatro ratones se inyectaron i.v. con cualquier vehículo trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)₂ (derivado de **39**, a 3 mg/kg y 9 mg/kg), trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)₂ (derivado de **37b**, a 3 mg/kg y 9 mg/kg), y T-DM1 (9 mg/kg).

Análisis espectrométrico de masas detallado de trastuzumab y derivados

[0333] El trastuzumab nativo, trastuzumab(GalNAz)₂, y conjugados de biotina preparados a partir de trastuzumab(GalNAz)₂ por química click catalizada con cobre (conjugación con **46** según el protocolo descrito en el ejemplo 29) o por química click promovida por tensión (conjugación con **25** como se describe en el ejemplo 16) se sometieron a análisis de espectros de masas detallados de especies de proteína intactas (nanoLC-MS) usando nanoLC acoplado a resolución ultraelevada QTOF MS (maXis 4G).

Ejemplo 38: Análisis de proteína intacta

Preparación de la muestra

[0334] La reducción de proteína se realizó durante 30 minutos en 10 mM de DTT a 56 °C. Las muestras se diluyeron 1:1 en 2 % de ácido fórmico antes del análisis.

Cromatografía en fase líquida - espectrometría de masas

[0335] Las separaciones de proteínas se realizaron utilizando una cromatografía en fase líquida de nanoflujo UHPLC (Bruker Daltonics nano advance) acoplada en línea a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo tetrapolar de resolución ultraelevada (Bruker Daltonics maXis 4G ETD) mediante una fuente de electrospray asistida con vacío de desolvatación axial (pulverizador interno de Bruker Daltonics). Las proteínas se cargaron en la columna de trampa (Dionex PepSwift, 0,2 x 5 mm) en 3 minutos con un caudal de flujo de 5000 nL/min utilizando 0,1 % de ácido fórmico. Las proteínas se separaron en una columna de partículas monolíticas 0,2 x 150 mm (Michrom 8µm 4000Å PLRP-S) a 50 °C utilizando un gradiente lineal de 20 a 50 % de acetonitrilo y de 0,1 % de ácido fórmico con un caudal de flujo de 1000 nL/min. La desolvatación e ionización de péptidos que eluyen a partir de la columna se realizó utilizando 6 L/min de gas nitrógeno a 180 °C y 1600 V de voltaje capilar. El espectrómetro de masas se calibró externamente utilizando mezcla de ajuste de Agilent (G1969-85000) y se usó calibración de estándar de referencia a 1221,9906 m/z (Agilent G1982-85001). El espectrómetro de masas se programó para los espectros adquiridos en el rango de 500-4200 m/z a 1 Hz con los ajustes siguientes: 400 Vpp embudo RF, 10 eV isCID, 400 Vpp multipolar RF, 8 eV energía iónica tetrapolar, 510 m/z masa baja, 10 eV energía de célula de colisión, 3500 Vpp colisión RF, 110 µs tiempo de transferencia, 450 Vpp refrigerador de iones RF y 18 µs almacenamiento prepulso.

Procesamiento de datos

[0336] Todos los datos se procesaron en el software de análisis de datos. Después de la calibración del estándar de calibración de masa, los espectros MS de las cadenas ligeras y pesadas se promediaron sobre cada valor máximo cromatográfico, respectivamente. Los espectros promediados se descircunvolvieron utilizando el algoritmo de entropía máxima en combinación con el algoritmo de selección de valor máximo SNAP para el espectro de la cadena ligera o selección del valor máximo de suma para el espectro de la cadena pesada.

*Ejemplo 39 Análisis de péptido proteolítico*Preparación de la muestra

[0337] De cada muestra, cinco microgramos de proteína se sometieron a digestión trípica en la solución. Brevemente, la reducción se realizó en 10 mM de DTT durante 30 minutos a 56 °C. La alquilación de las cisteínas reducidas (carbamidometilación) se realizó utilizando 50 mM de cloroacetamida. La digestión de proteína se realizó primero mediante adición de 0,5 µg de LysC peptidasa e incubación durante 3 horas a 37 °C. A continuación, 800 ng de tripsina se añadieron a la muestra y se incubaron O/N a 37 °C. Péptidos proteolíticos resultantes se concentraron y desalaron usando puntas de elución intermitente.

Cromatografía en fase líquida - espectrometría de masas en tándem

[0338] Las separaciones de péptidos se realizaron utilizando un cromatógrafo de líquido de nanoflujo UHPLC (Bruker Daltonics nano advance) acoplado en línea a una trampa de iones de alta capacidad (Bruker Daltonics amaZon speed ETD) mediante una fuente de electrospray asistida con vacío de desolvatación axial (pulverizador interno Bruker Daltonics). Los péptidos se cargaron en la columna de la trampa (Dionex PepSwift, 0,2 x 5 mm) en 3 minutos con un caudal de flujo de 5000 nL/min utilizando 0,1 % de ácido fórmico. Los péptidos se separaron en una columna monolítica 0,1 x 250 mm (Dionex PepSwift) a 60 °C utilizando un gradiente lineal de 5 a 25 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico con un caudal de flujo de 800 nL/min. La desolvatación e ionización de los péptidos que eluyen de la columna se realizaron utilizando 3 L/min de gas nitrógeno a 150 °C y 1300 V de voltaje capilar. El espectrómetro de masas se programó para adquirir un espectro de encuesta única (MS) con análisis de fragmentación dependiente de datos posterior (MS/MS) del top 6 de los iones más abundantes. Los espectros de la encuesta se adquirieron en modo de resolución mejorada y usaron los siguientes ajustes del instrumento: tiempo de acumulación máxima 50 ms, ICC objetivo 500,000, sintonización a 1000 m/z , promedios de espectros 5. Los espectros de fragmentación se adquirieron en el modo de exploración de extremos con modo de autoselección de fragmentación habilitado que cambia entre disociación inducida por colisión (CID) y métodos de fragmentación de disociación de transferencia electrónica (ETD) basados en la proporción masa-carga y el estado de carga del ion precursor. Los siguientes ajustes del instrumento se usaron para escaneos de fragmentación: ICC objetivo 500,000, tiempo de acumulación máxima 200 ms, SPS habilitado, energía CID 70 % y exclusión dinámica 0,2 min.

Búsquedas de base de datos

[0339] Los datos de espectrometría de masas en bruto adquiridos se procesaron mediante software de análisis de datos (Bruker Daltonics, v4.1) para generar archivos de entrada compatibles con Mascot (formato GMF). Los archivos

GMF se cargaron en el software ProteinScape (Bruker Daltonics, V3.1) y se buscan en una base de datos de secuencias utilizando el software de búsqueda de bases de datos de Mascot. La base de datos de secuencias FASTA contenía las secuencias de proteínas de cadena ligera y pesada de trastuzumab con secuencias proteínicas contaminantes adicionadas (por ejemplo, LysC, Tripsina y queratinas). Se realizaron búsquedas utilizando los ajustes siguientes: tolerancia de masa precursora 0,35 Da, tolerancia de masa de ion de fragmento 0,35 Da, especificidad triptica con un máximo de 2 escisiones omitidas, carbamidometilación (C) como modificación fija. Las modificaciones variables siguientes se especificaron: oxidación (MHW), desamidación (NQ), carbamilación (K + N-terminal) y acetilación (proteína N-terminal). Los péptidos con puntuaciones de ion de Mascot sobre el umbral de puntuación de identidad se aceptaron como identificaciones válidas (tasa de descubrimientos falsos de péptido < 1 %).

Cuantificación relativa

[0340] Para la proteína de cadena pesada de trastuzumab, un péptido único con oxidación de histidina (secuencia K.FNWYVDGVEVH*NAK.T, con H11 oxidado) se identificó exclusivamente en el conjugado de trastuzumab obtenido por conjugación catalizada con cobre de 46, pero no se detectó ninguno en las otras muestras. Los cromatogramas corrientes de ion extraído (EIC) para el péptido con y sin histidina oxidada (EIC: 847,46 ± 0,5 *m/z* y EIC: 839,97 ± 0,5 *m/z*, respectivamente) se generaron en software DataAnalysis. Además, cromatogramas EIC para los siguientes dos péptidos se usaron con fines de normalización: -.EVQLVESGGGLVQPGGSLR.L (EIC: 941,6 ± 0,5 *m/z*) y K.GPSVFPLAPSSK.S (EIC: 593,95 ± 0,5 *m/z*). Las áreas de valor máximo integradas de las tres mediciones replicadas se promediaron y se expresaron con respecto a trastuzumab nativo, lo que indica que el fragmento anterior con histidina oxidada equivale al 69 % del total de ese fragmento particular (31 % de fragmento sin modificar).

[0341] Para la proteína de cadena ligera de trastuzumab, un péptido único con oxidación de metionina (secuencia -.DIQM*TQSPSSLSASVGDR.V, con M4 oxidado) se identificó exclusivamente en el conjugado de trastuzumab obtenido por conjugación catalizada con cobre de 46, pero no se detectó ninguno en las otras muestras.

Ejemplo 40: Clonación y expresión de mutantes de GalT mutantes Y289N, Y289F, Y289M, Y289V, Y289A e Y289G e Y289I.

[0342] Los genes mutantes de GalT se amplificaron a partir de un constructo con la secuencia que codifica el dominio catalítico de GalT que consta de residuos 130-402 aa, mediante el método PCR de extensión de superposición. La enzima de tipo salvaje se representa mediante la SEQ ID N°: 17. Para el mutante Y289N (representado con la SEQ ID N°: 18), el primer fragmento de ADN se amplificó con un par de cebadores: Oligo38_GalT_External_Fw (CAG CGA CAT ATG TCG CTG ACC GCA TGC CCT GAG GAG TCC representado por la SEQ ID N°: 1) y Oligo19_GalT_Y289N_Rw (GAC ACC TCC AAA **GTT** CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA representado por la SEQ ID N°: 2). El sitio de restricción *NdeI* está subrayado, mientras que el sitio de mutación está destacado en negrita. El segundo fragmento se amplificó con un par de cebadores: Oligo29_GalT_External_Rw (CTG ATG GAT GGA TCC CTA GCT CGG CGT CCC GAT GTC CAC representado por la SEQ ID N°: 3) y Oligo18_GalT_Y289N_Fw (CCT TAC GTG CAG **AAC** TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA representado por la SEQ ID N°: 4). El sitio de restricción *BamHI* está subrayado, mientras que el sitio de mutación está destacado en negrita. Los dos fragmentos generados en el primer ciclo de PCR se fusionaron en el segundo ciclo usando cebadores Oligo38_GalT_External_Fw y Oligo29_GalT_External_Rw. Después de la digestión con *NdeI* y *BamHI*, este fragmento se ligó al vector pET16b escindido con las mismas enzimas de restricción. El vector de expresión recientemente construido contenía el gen que codifica mutante Y289N y la secuencia que codifica la etiqueta His del vector pET16b, lo que fue confirmado por los resultados de secuenciación del ADN. Para la construcción de los mutantes Y289F (representado por la SEQ ID N°: 19), Y289M (representado por la SEQ ID N°: 20), Y289I (representado por la SEQ ID N°: 21), Y289V (representado por la SEQ ID N°: 22), Y289A (representado por la SEQ ID N°: 23) e Y289G (representado por la SEQ ID N°: 24) se usó el mismo procedimiento, con los sitios de mutación cambiados a tripletes **TTT**, **ATG**, **ATT**, **GTG**, **GCG** o **GGC** que codifican fenilalanina, metionina, isoleucina, valina, alanina o glicina, respectivamente. Más específicamente, para la construcción de Y289F el primer fragmento de ADN se amplificó con un par de cebadores definidos aquí como la SEQ ID N°: 1 y la SEQ ID N°: 5 y el segundo fragmento se amplificó con un par de cebadores definidos aquí como la SEQ ID N°: 3 y la SEQ ID N°: 6 (refiérase a la tabla 1 para las secuencias relativas). Además, para la construcción de Y289M el primer fragmento de ADN se amplificó con un par de cebadores definidos aquí como la SEQ ID N°: 1 y SEQ ID N°: 7 y el segundo fragmento se amplificó con un par de cebadores definidos aquí como la SEQ ID N°: 3 y la SEQ ID N°: 8 (refiérase a la tabla 1 para las secuencias relativas).

[0343] Los mutantes de GalT se expresaron, aislaron y replegaron a partir de cuerpos de inclusión según el procedimiento proporcionado por Qasba *et al.* (*Prot. Expr. Pur.* 2003, 30, 219-229). Después del repliegue, el precipitado se extrajo y la proteína soluble y plegada se aisló utilizando una columna de Ni-NTA (columna 1 mL excel HisTrap, GE Healthcare). Después de la elución con 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0, 300 mM de NaCl y 200 mM de

imidazol, la proteína se dializó contra 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 y se concentró a 2 mg/mL utilizando un filtro de centrifugado (unidad de filtrado centrífugo Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-10, Merck Millipore).

Tabla 1 Identificación de secuencias de los cebadores usados

SEQ ID Nº	Secuencia de nucleótidos
SEQ ID Nº: 1	CAG CGA CAT ATG TCG CTG ACC GCA TGC CCT GAG GAG TCC
SEQ ID Nº: 2	GAC ACC TCC AAA GTT CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID Nº: 3	CTG ATG GAT GGA TCC CTA GCT CGG CGT CCC GAT GTC CAC
SEQ ID Nº: 4	CCT TAC GTG CAG AAC TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID Nº: 5	GAC ACC TCC AAA AAA CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID Nº: 6	CCT TAC GTG CAG TTT TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID Nº: 7	GAC ACC TCC AAA CAT CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID Nº: 8	CCT TAC GTG CAG ATG TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID Nº: 9	GAC ACC TCC AAA AAT CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID Nº: 10	CCT TAC GTG CAG ATT TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID Nº: 11	GAC ACC TCC AAA CAC CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID Nº: 12	CCT TAC GTG CAG GTG TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID Nº: 13	GAC ACC TCC AAA CGC CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID Nº: 14	CCT TAC GTG CAG GCG TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID Nº: 15	GAC ACC TCC AAA GCC CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID Nº: 16	CCT TAC GTG CAG GGC TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA

5

Ejemplo 41: Transferencia de UDP-GalNAz con mutantes de GalT Y289N, Y289F e Y289M.

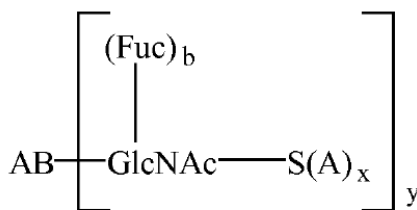
[0344] La introducción enzimática de derivado de galactosa en trastuzumab se efectuó con uno de los mutantes de $\beta(1,4)$ -Gal-T1 Y289N, Y289F o Y289M. Así, el trastuzumab desglicosilado (preparado como se ha descrito anteriormente, 10 mg/mL) se incubó con UDP-N azidoacetilgalactosamina **52** (UDP-GalNAz) (1 mM) y el respectivo mutante $\beta(1,4)$ -Gal-T1 (0,1 mg/mL) en 10 mM de MnCl₂ y 25 mM de Tris-HCl con pH 8,0 durante 16 horas a 30 °C.

[0345] Para los tres mutantes Y289N, Y289F o Y289M, el análisis de espectros de masas de la mezcla en bruto indicó la conversión limpia de trastuzumab sustituido con GlcNAc(Fuc) central en trastuzumab(GalNAz)₂ (49713 Da, 90 % de la cadena pesada total).

15

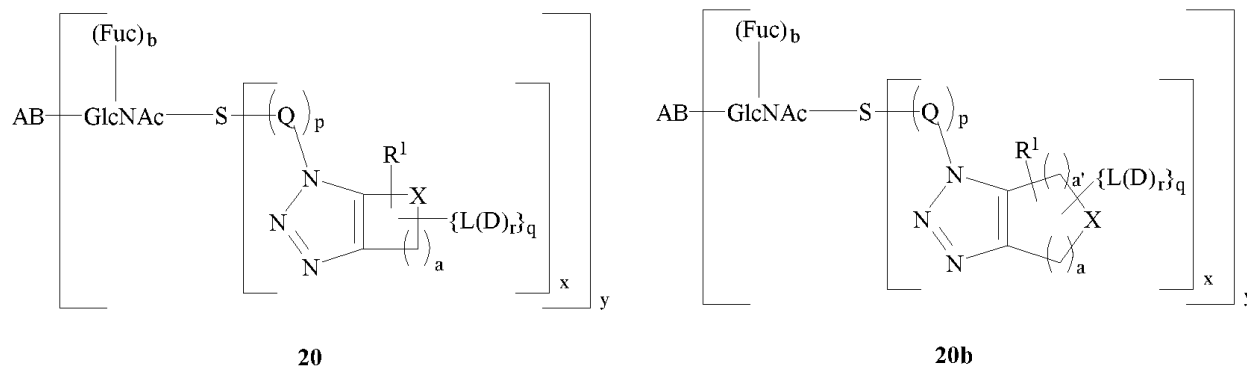
REIVINDICACIONES

1. Conjugado de anticuerpo para su uso como medicamento, donde el anticuerpo modificado se puede obtener mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo y una o más sustancias que son farmacológicamente activas, donde dicho anticuerpo modificado es un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x, donde GlcNAc es una N-acetilglucosamina, donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A, donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x se une al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x, y donde dicha GlcNAc está opcionalmente fucosilada, donde una o más sustancias que son farmacéuticamente activas son citotoxinas y donde el anticuerpo se une específicamente al antígeno del cáncer.
2. Conjugado de anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer, donde el conjugado de anticuerpo es como se define en la reivindicación 1, preferiblemente donde el cáncer es cáncer de mama.
3. Conjugado de anticuerpo para su uso según la reivindicación 2, donde el conjugado de anticuerpo tiene un efecto sobre el volumen del tumor.
4. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el proceso comprende los pasos:
- (i) poner en contacto un anticuerpo que comprende un sustituyente N-acetilglucosamina central (GlcNAc) con un compuesto de fórmula S(A)_x-P en presencia de un catalizador, donde dicho sustituyente N-acetilglucosamina central es opcionalmente fucosilado, donde dicho catalizador comprende un dominio catalítico mutante de una galactosiltransferasa, donde S(A)_x es un derivado de azúcar que comprende x grupos funcionales A donde A es un grupo azida y x es 1, 2, 3 o 4, donde P se selecciona del grupo que consta de difosfato de uridina (UDP), difosfato de guanosina (GDP) y difosfato de citidina (CDP), para obtener un anticuerpo modificado, donde un anticuerpo modificado se define como un anticuerpo que comprende un sustituyente GlcNAc-S(A)_x enlazado al anticuerpo mediante el C1 de la N-acetilglucosamina de dicho sustituyente GlcNAc-S(A)_x, y donde dicho anticuerpo modificado es según la fórmula (4):



4

- donde S(A)_x y x son tal y como se ha definido anteriormente; AB representa un anticuerpo; GlcNAc es N-acetilglucosamina; Fuc es fucosa; b es 0 o 1; e y es de 1 a 20; y
- (ii) hacer reaccionar dicho anticuerpo modificado con un conjugado de enlazador, donde dicho conjugado de enlazador comprende un grupo (hetero)cicloalquinilo y una o más citotoxinas.
5. Anticuerpo conjugado para su uso según la reivindicación 4, donde el catalizador comprende un dominio catalítico mutante a partir de una β(1,4)-galactosiltransferasa, preferiblemente donde el catalizador se selecciona a partir del grupo que consta de GalT Y289L, GalT Y289N, GalT Y289I o se selecciona a partir del grupo que consta de GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I y GalT Y289A.
6. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grupo (hetero)cicloalquinilo es un grupo (hetero)ciclooctinilo.
7. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el conjugado de anticuerpo es según la fórmula (20) o (20b):



donde:

- L es un enlazador;
- D es una citotoxina;
- r es 1 - 20;
- R¹ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, -OR⁵, -NO₂, -CN, -S(O)₂R⁵, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄ y donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen opcionalmente, donde dos sustituyentes R¹ se pueden enlazar juntos para formar un cicloalquilo anillado o un sustituyente (hetero)areno anillado, y donde R⁵ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄;
- X es C(R¹)₂, O, S o NR², donde R² es R¹ o L(D)_r, y donde L, D y r son tal y como se ha definido anteriormente;
- q es 0 o 1, con la condición de que si q es 0, entonces X es N-L(D)_r;
- b es 0 o 1;
- p es 0 o 1;
- Q es -N(H)C(O)CH₂- o -CH₂-;
- x es 1, 2, 3 o 4;
- y es 1 - 20;
- AB es un anticuerpo;
- S es un azúcar o un derivado del azúcar;
- GlcNAc es N-acetilglucosamina; y
- Fuc es fucoso,

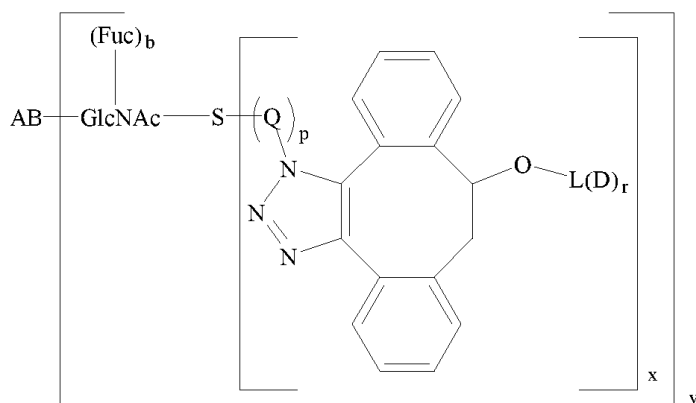
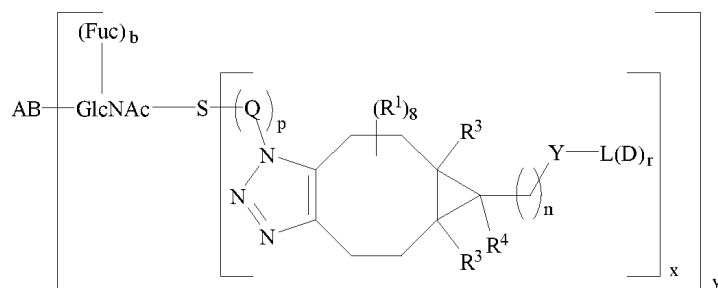
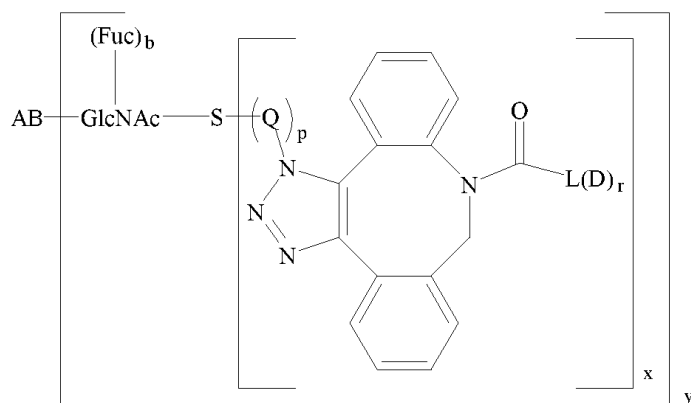
y donde:

- en la fórmula **(20)**, a es 4, 5, 6 o 7; y
- en la fórmula **(20b)**:

- a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7;
- a' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
- a+a' es 4, 5, 6 o 7,

preferiblemente donde en la fórmula **(20)** a es 5, y en la fórmula **(20b)** a+a' es 5.

8. conjugado de anticuerpo para uso según la reivindicación 7, en el que el conjugado de anticuerpo tiene la fórmula **(15b)**, **(21)** o **(22)**:

**15b****21****22**

donde:

- AB, GlcNAc, Fuc, L, D, S, Q, x, y, b, p, r, R¹ son tal y como se definen en la reivindicación 7;
- Y es O, S o NR², donde R² es tal y como se define en la reivindicación 7;
- R³ se selecciona independientemente del grupo que consta de hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁- C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄;
- R⁴ se selecciona del grupo que constan de hidrógeno, Y-L(D)_r, -(CH₂)_n-Y-L(D)_r, halógeno, grupos alquilo C₁ - C₂₄, grupos (hetero)arilo C₆ - C₂₄, grupos alquil(hetero)arilo C₇ - C₂₄ y grupos (hetero)arilalquilo C₇ - C₂₄, donde los grupos alquilo se interrumpen opcionalmente con uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consta de O, N y S, donde los grupos alquilo, grupos (hetero)arilo, grupos alquil(hetero)arilo y grupos (hetero)arilalquilo se sustituyen de manera independiente opcionalmente; y
- n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10,

9. Conjugado de anticuerpo para su uso según la reivindicación 7 u 8, donde:

- y es 1, 2, 3 o 4, preferentemente y es 1 o 2;
- x es 1 o 2, preferiblemente x es 1; y
- r es 1, 2, 3 o 4, preferiblemente r es 1 o 2,
- más preferiblemente donde x es 1, y es 1 y r es 1, o x es 1, y es 2 y r es 1, o x es 2, y es 2 y r es 1.

5

10. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia que es farmacéuticamente activa es una citotoxina seleccionada del grupo que consta de camptotecinas, doxorubicina, daunorrubicina, taxanos, caliqueamicinas, duocarmicinas, maitansinas, maitansinoides, auristatinas y pirrolobenzodiazepinas, más preferiblemente maitansina o monometil auristatina E (MMAE).

10

11. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo se selecciona de entre anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos.

15

12. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo es trastuzumab y la sustancia farmacéuticamente activa es una citotoxina seleccionada de maitansinoide, auristatina E, auristatina F, duocarmicina o pirrolobenzodiazepina.

20

13. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el enlazador es escindible, preferiblemente donde el enlazador escindible comprende un resto autoinmolable que se libera tras un desencadenante biológico, preferiblemente mediante una escisión enzimática o una oxidación. evento.

25

14. Conjugado de anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el conjugado de anticuerpo es homogéneo en especificidad de sitio y estequiometría, donde la conjugación se efectúa solo en un sitio predeterminado y en una proporción fármaco-anticuerpo predeterminada.

15. Conjugado de anticuerpo para su uso según la reivindicación 14, donde la DAR está dentro del 10 % de su valor teórico, preferiblemente donde la DAR es 2, 4 u 8.

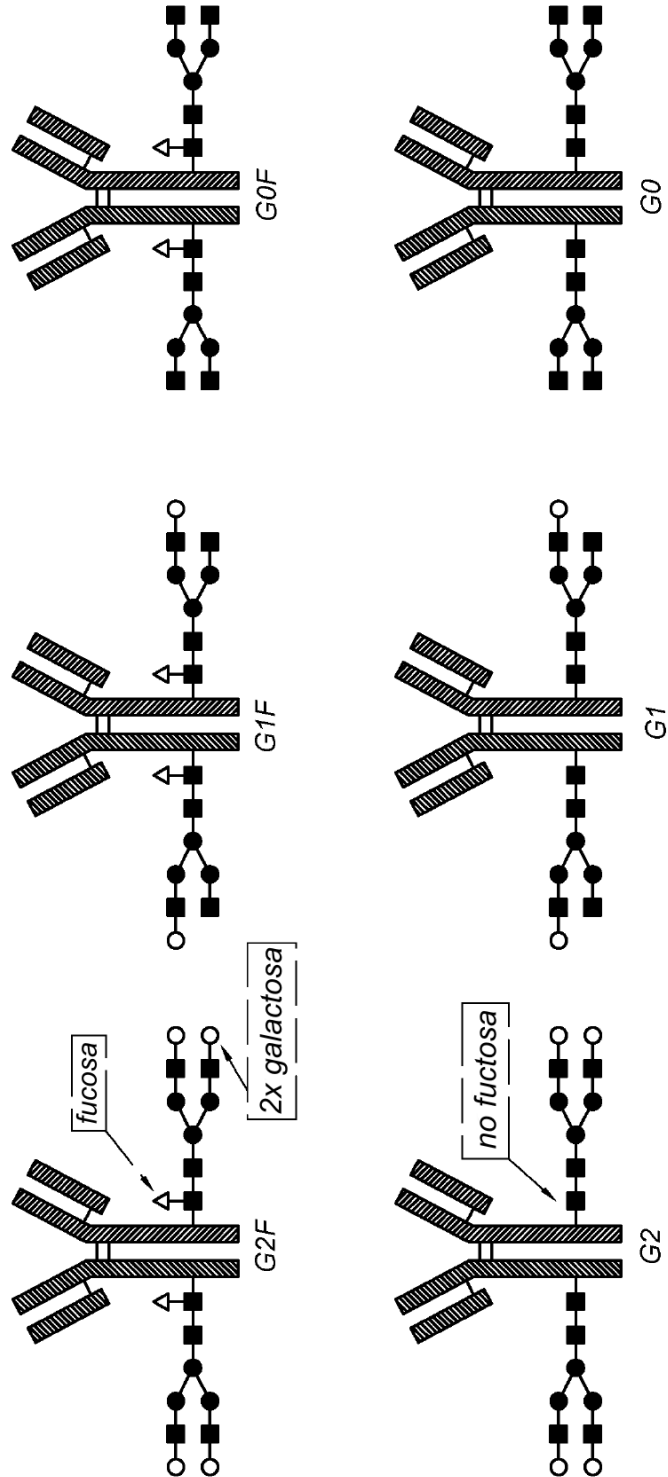
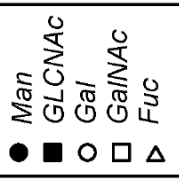


Fig. 1

Fig. 2

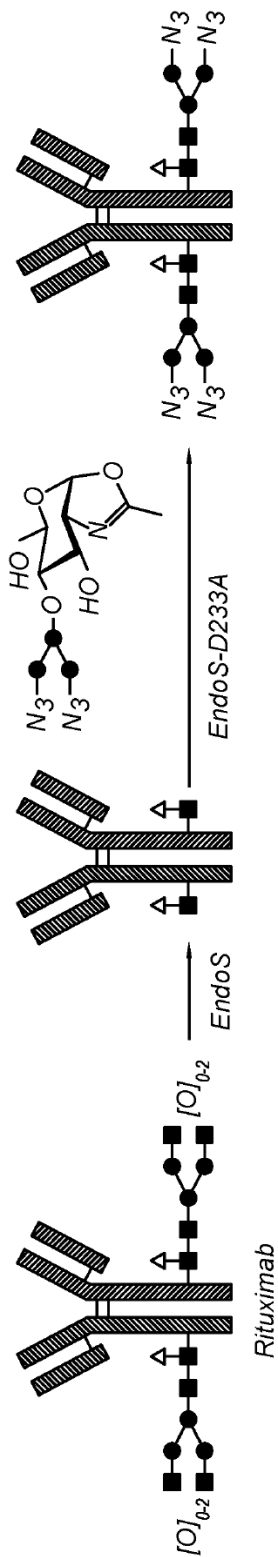


Fig. 3

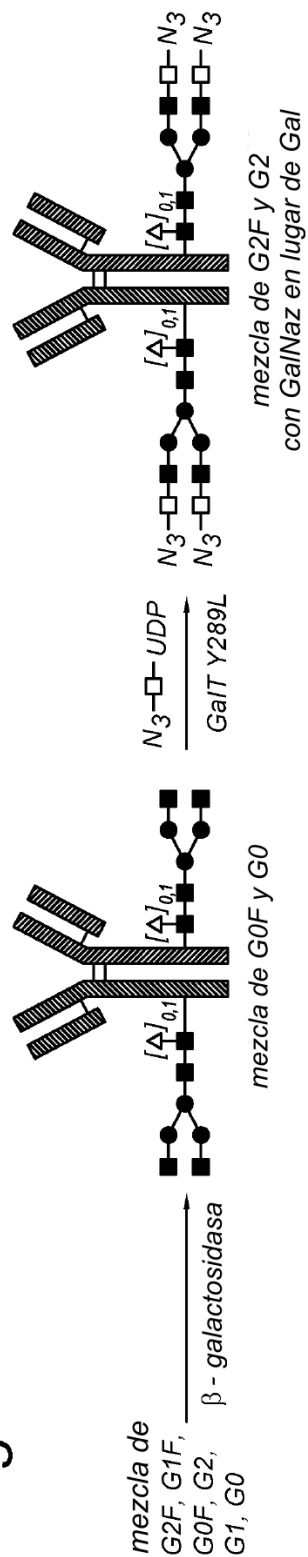


Fig. 4

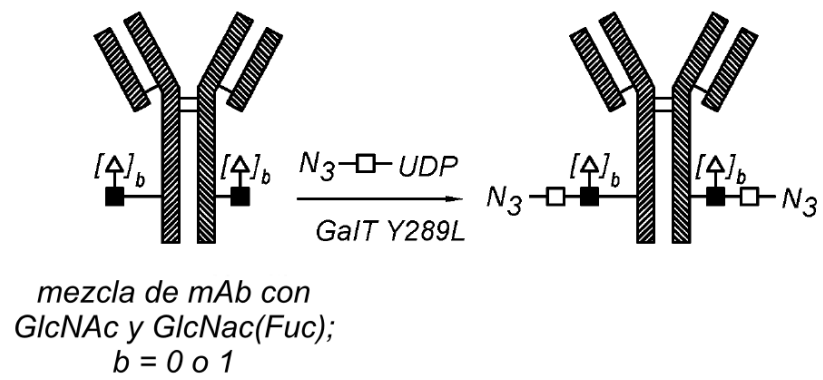


Fig. 5

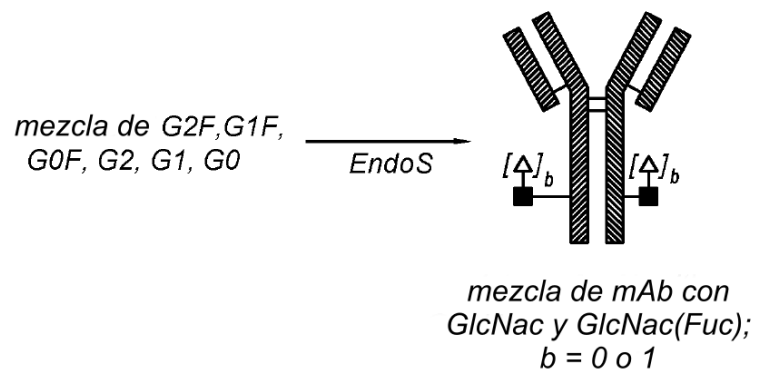


Fig. 6

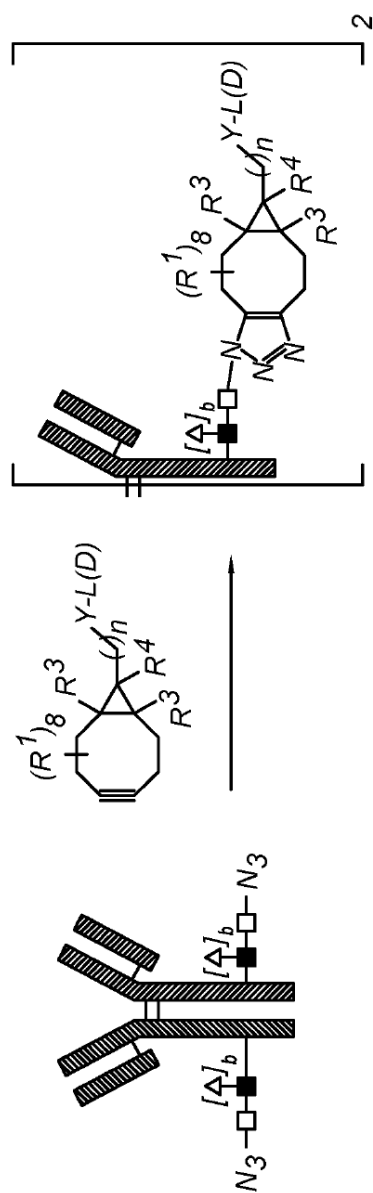
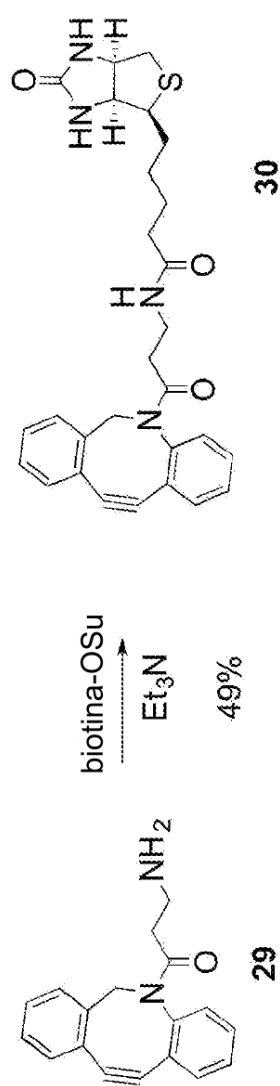


Fig. 8



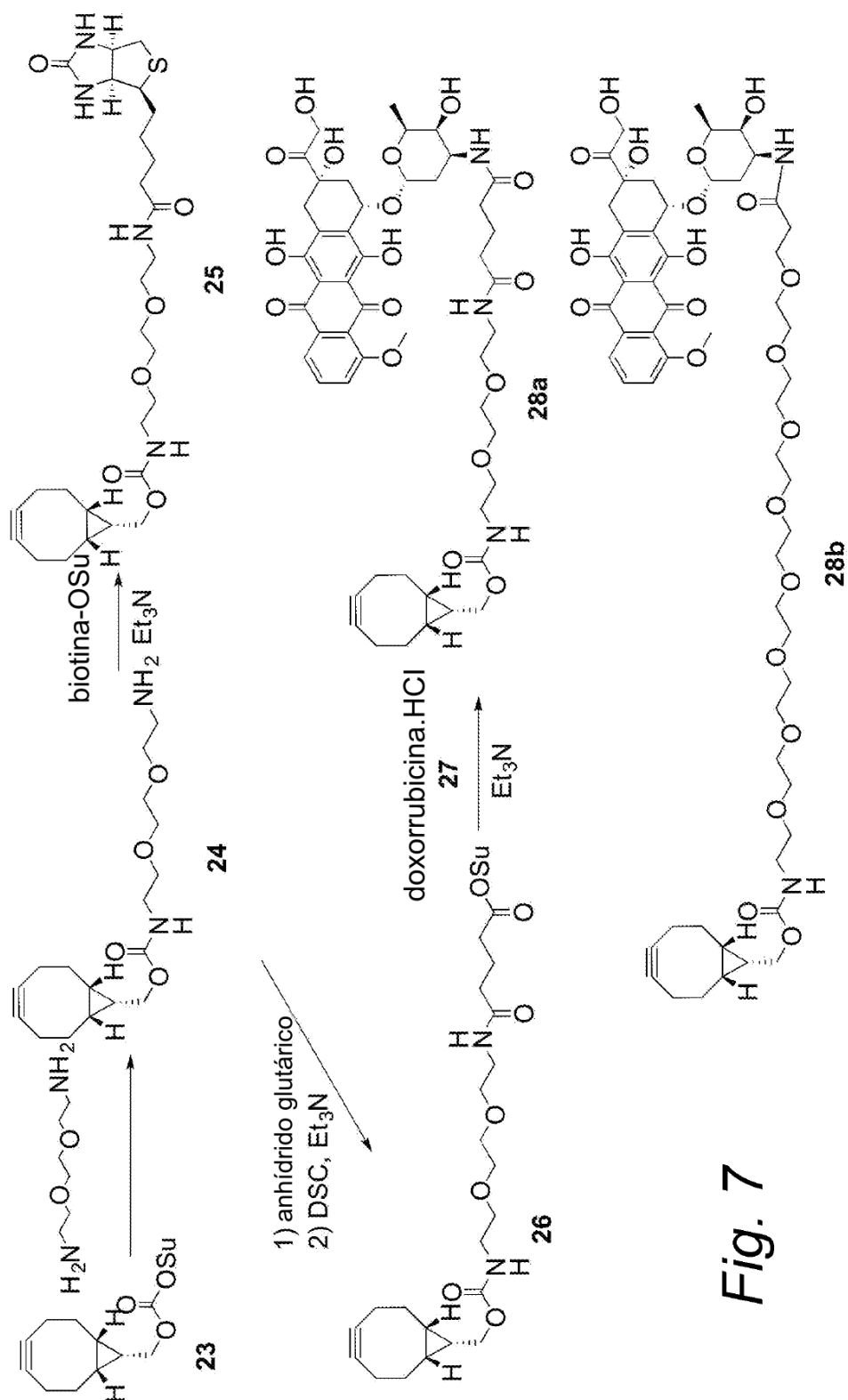


Fig. 7

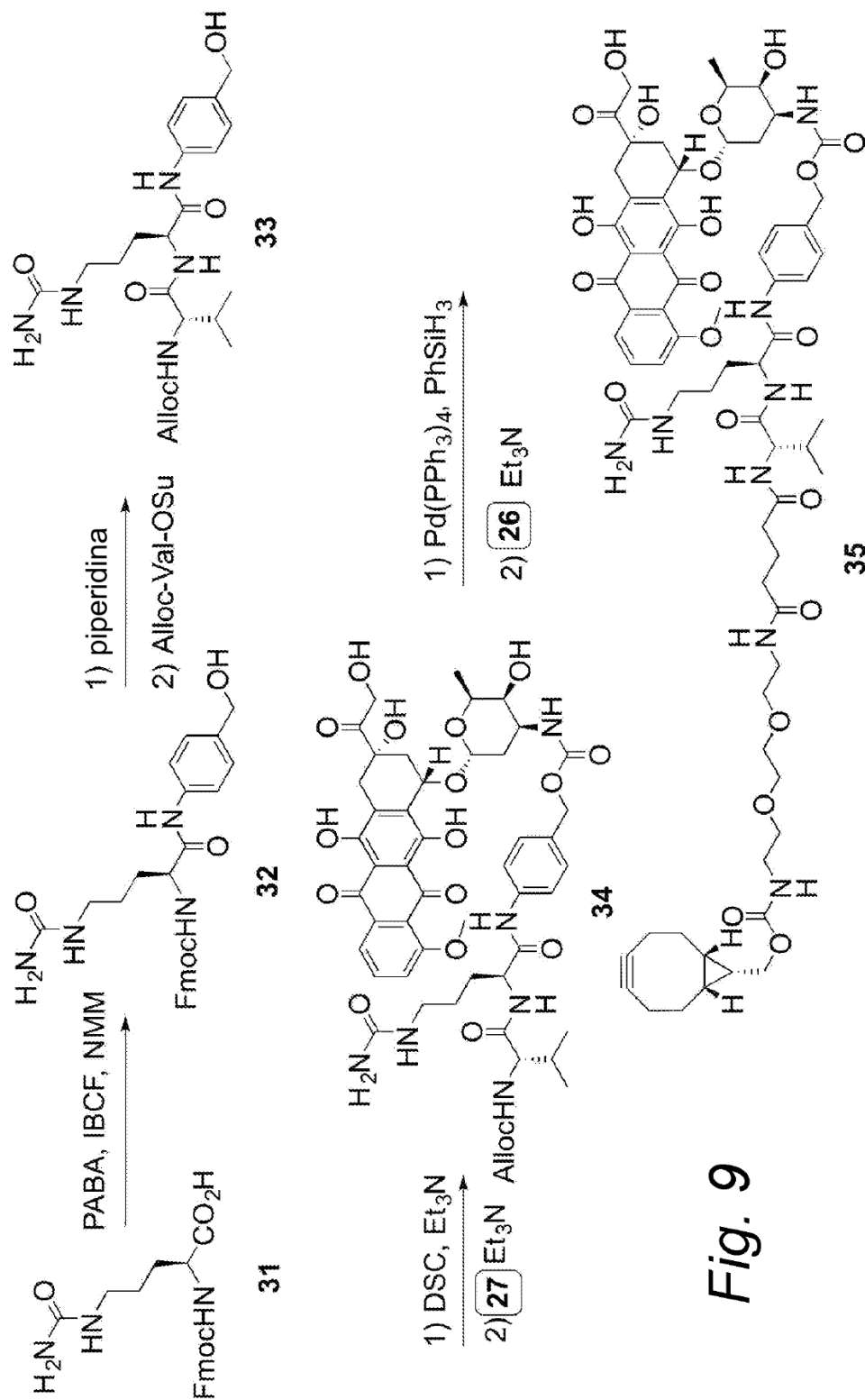


Fig. 9

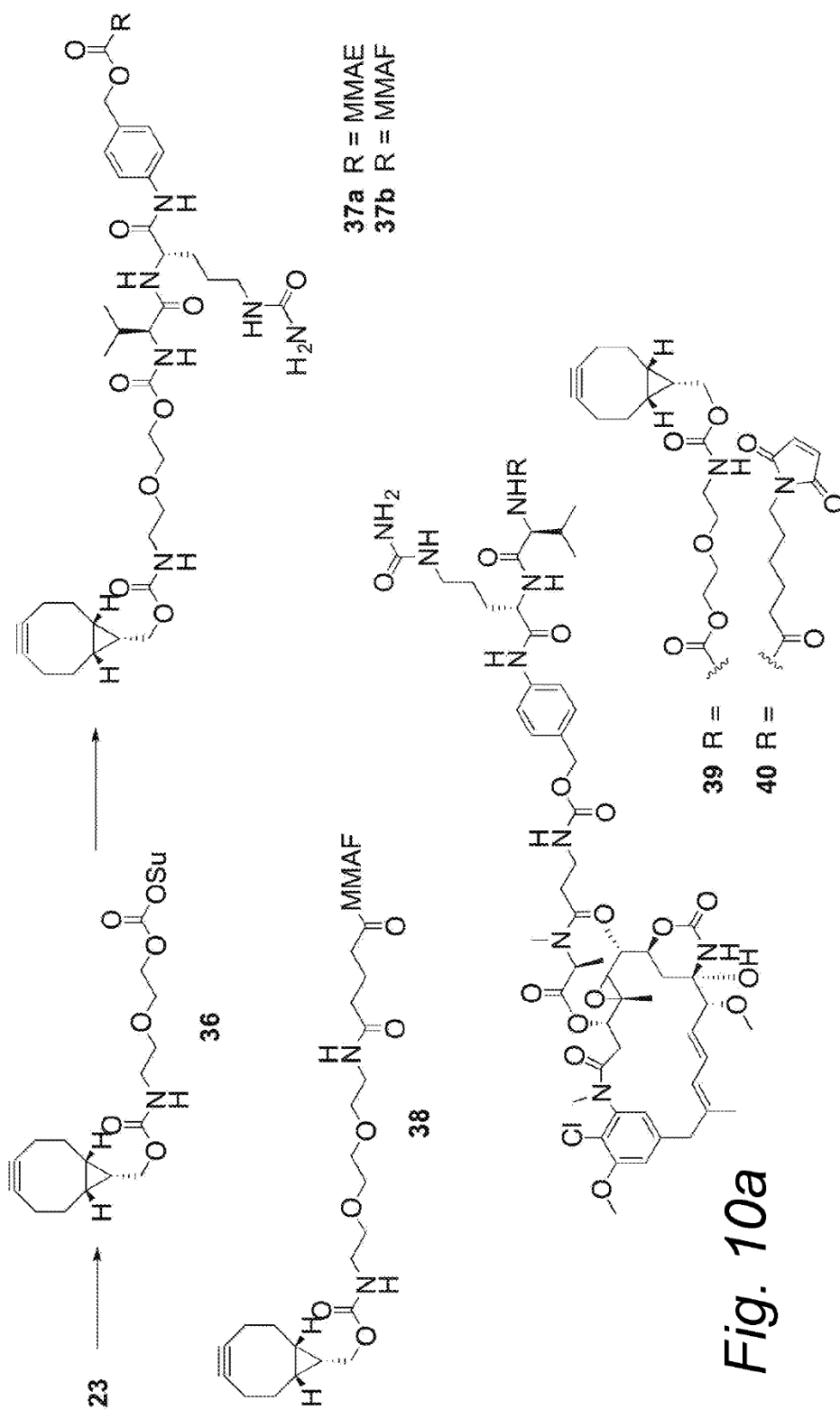


Fig. 10a

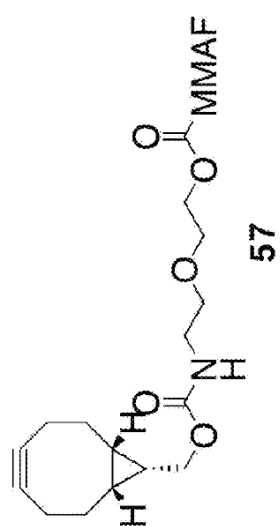


Fig. 10b

Fig. 11

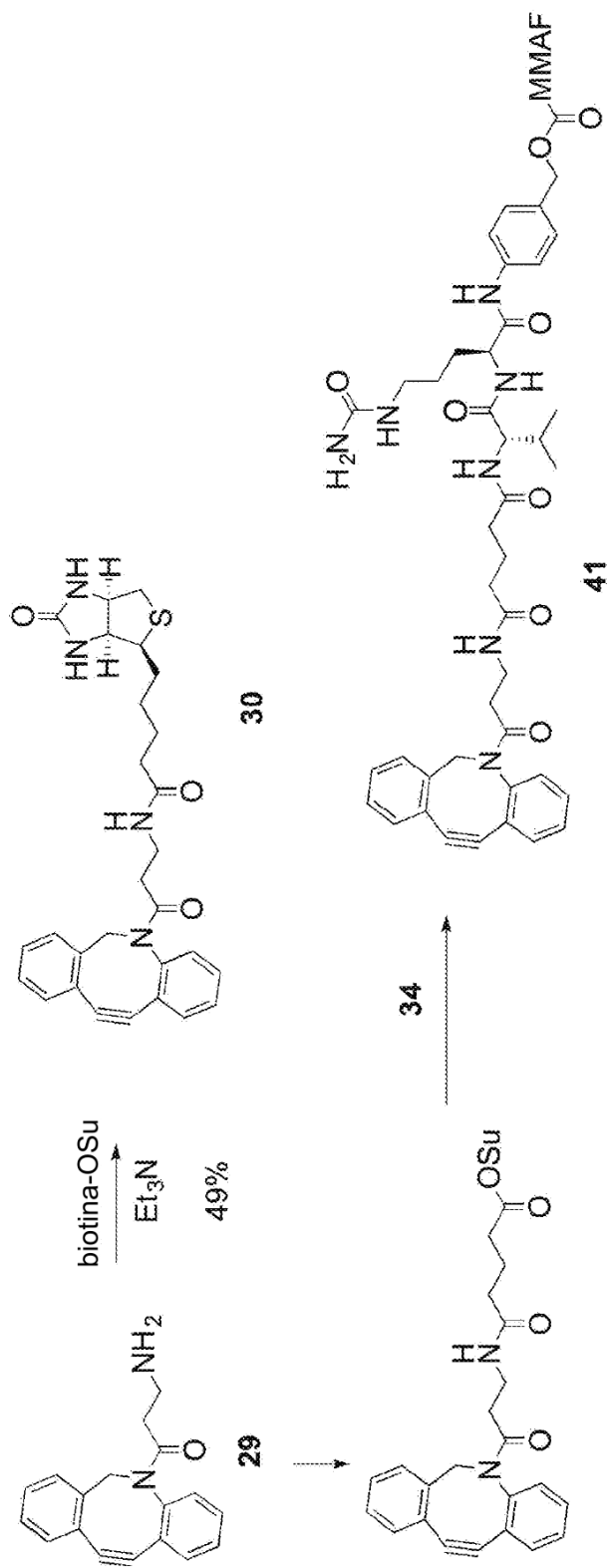


Fig. 12

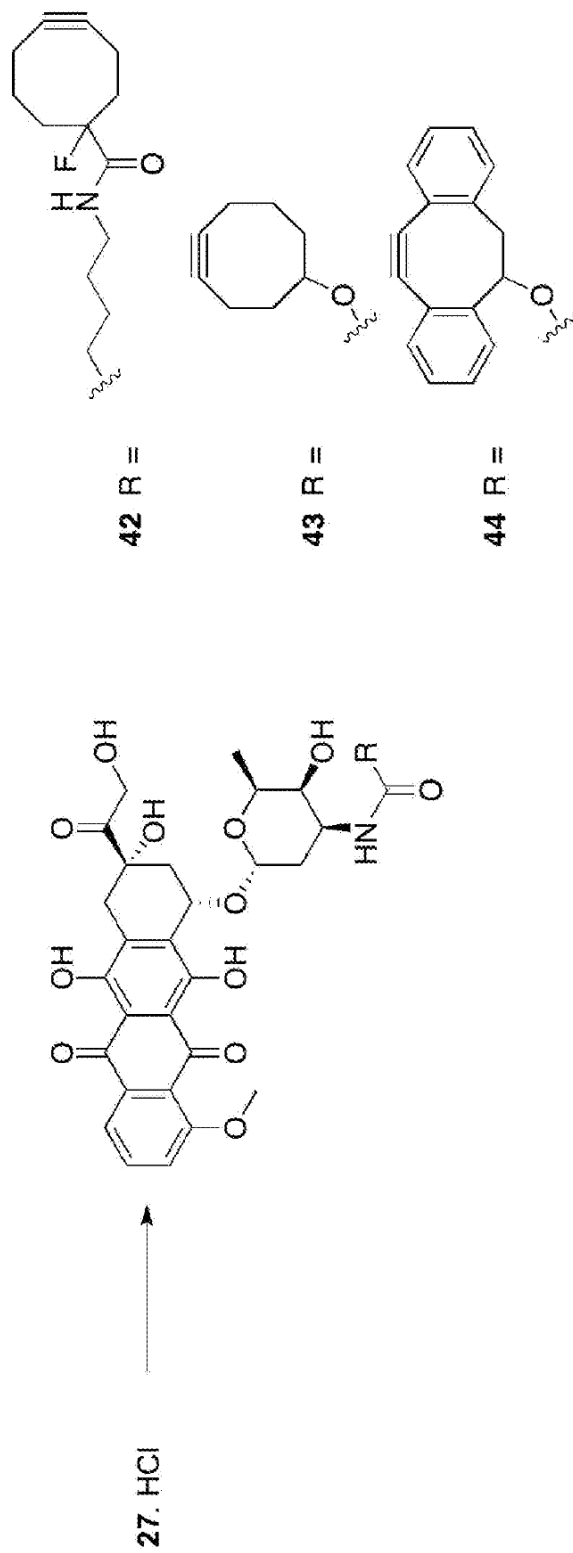


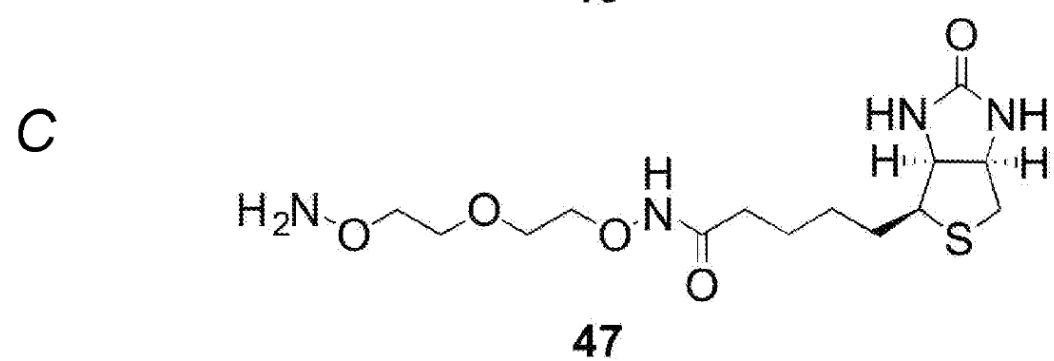
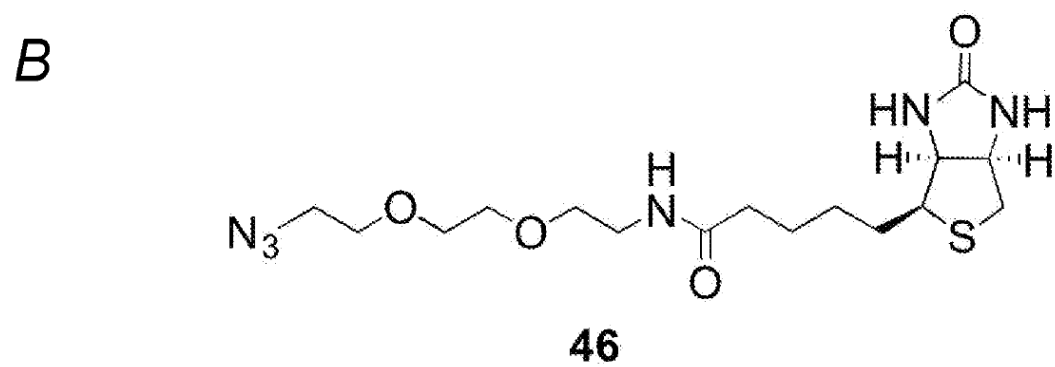
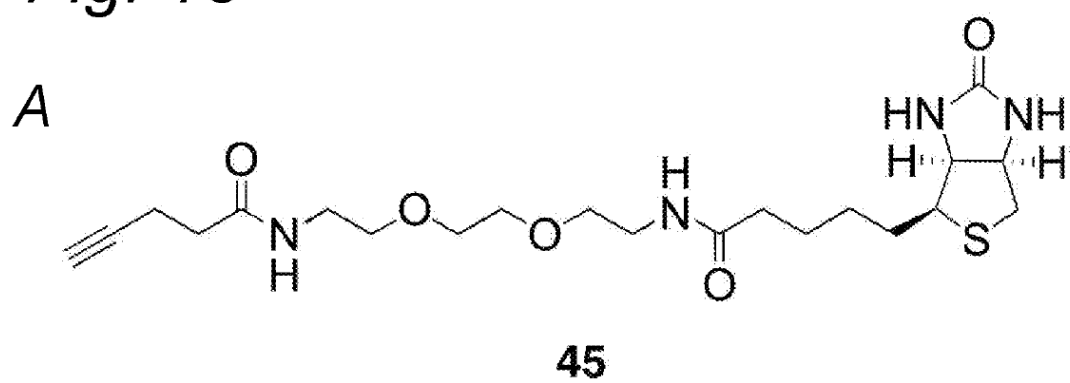
Fig. 13

Fig. 14

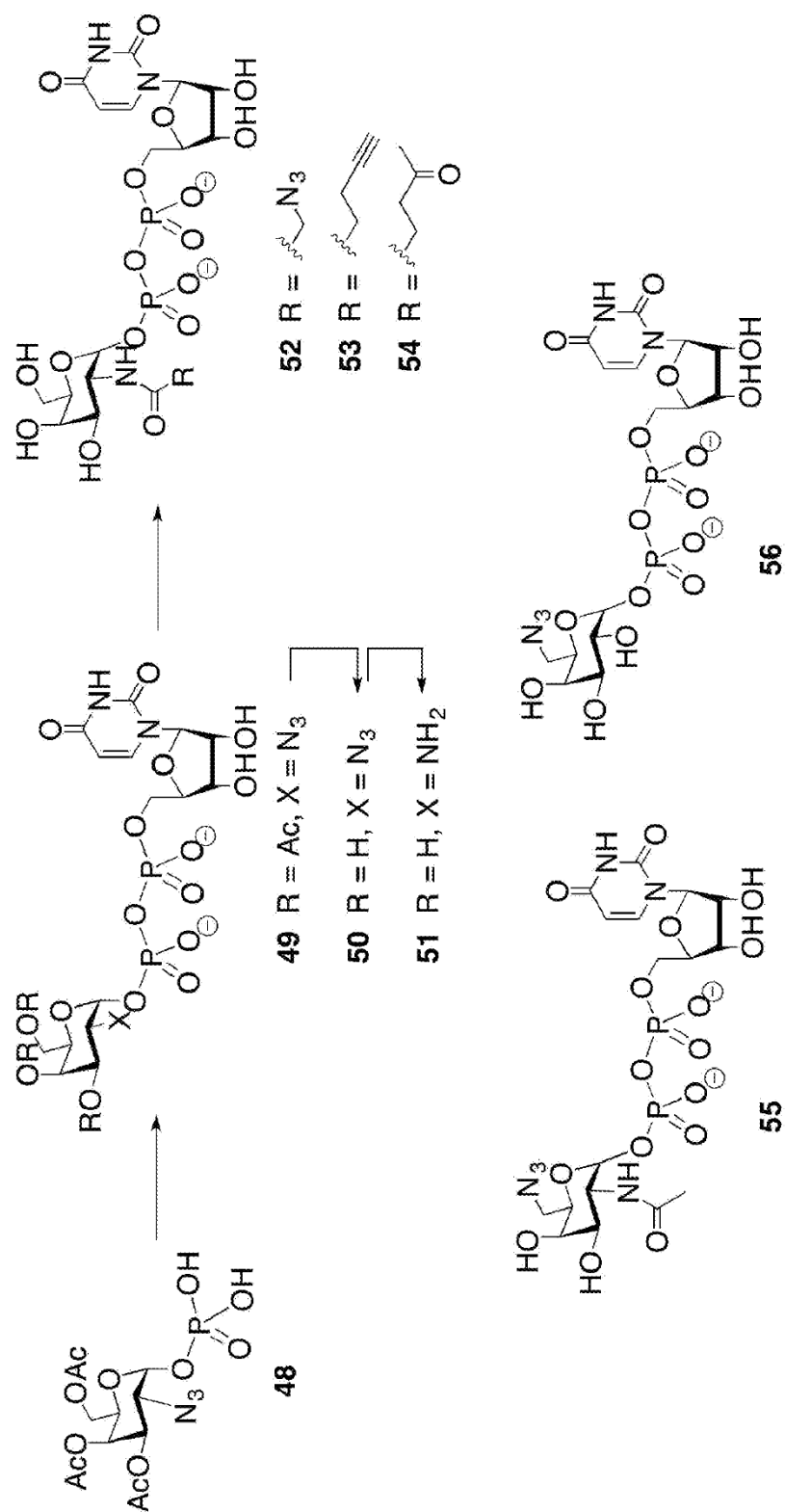


Fig. 15a

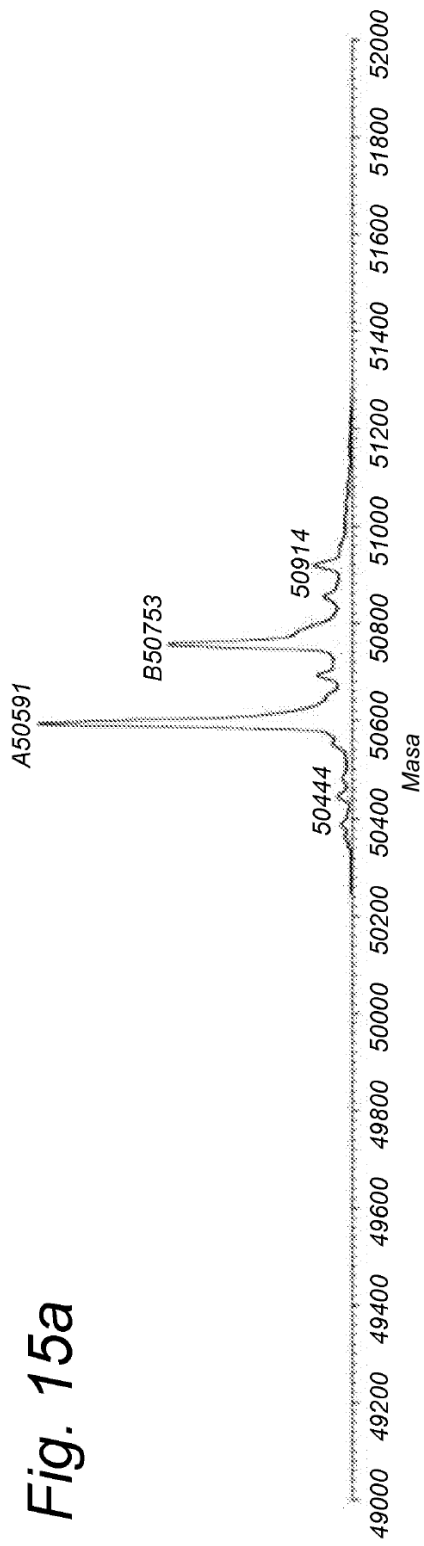


Fig. 15b

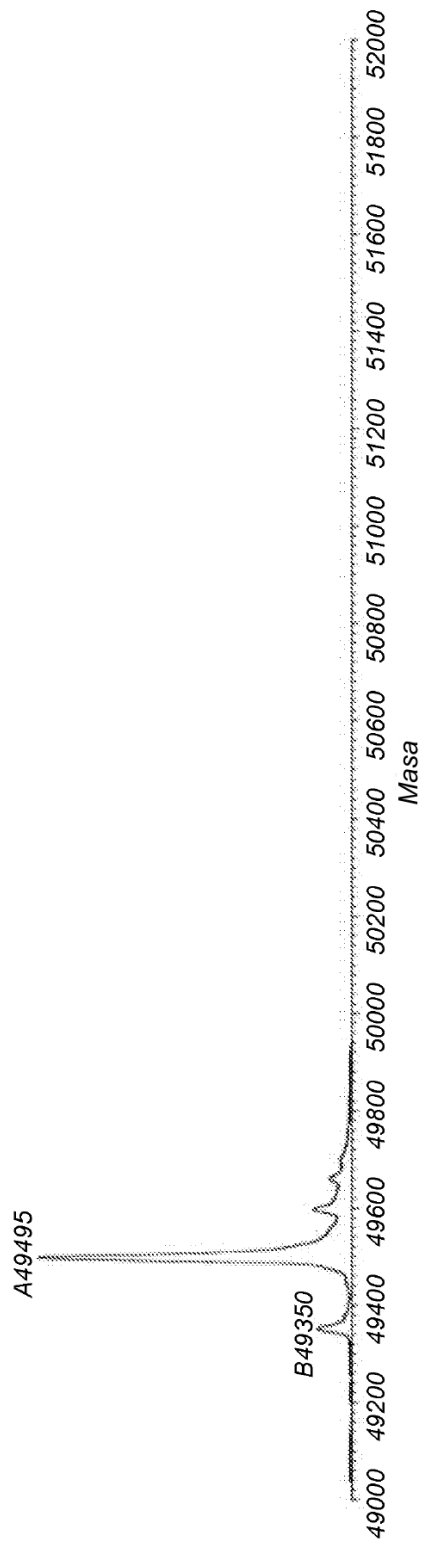


Fig. 15c

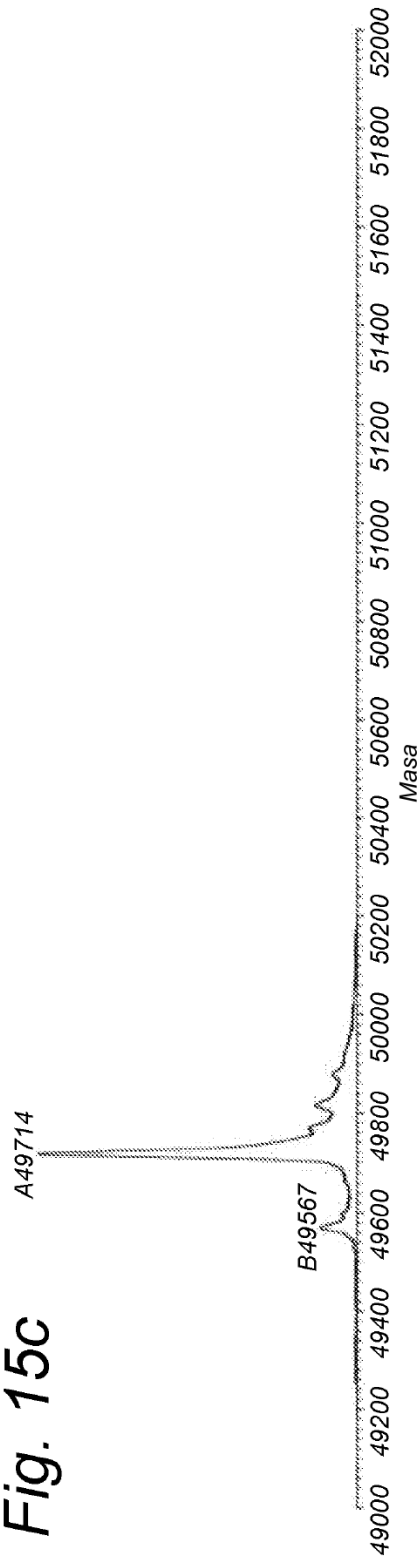


Fig. 15d

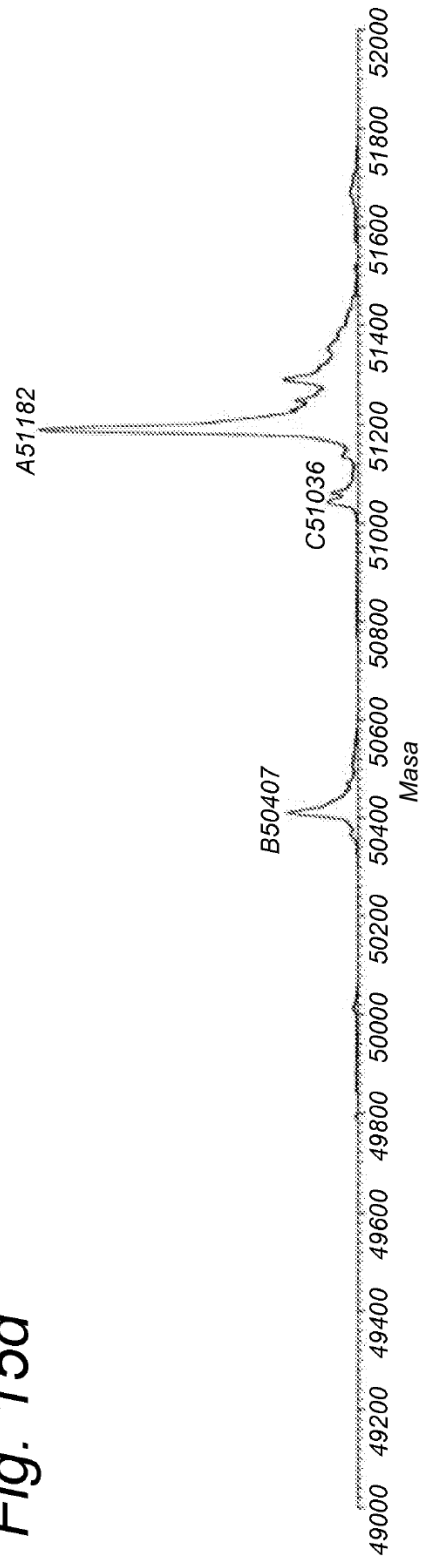


Fig. 16a

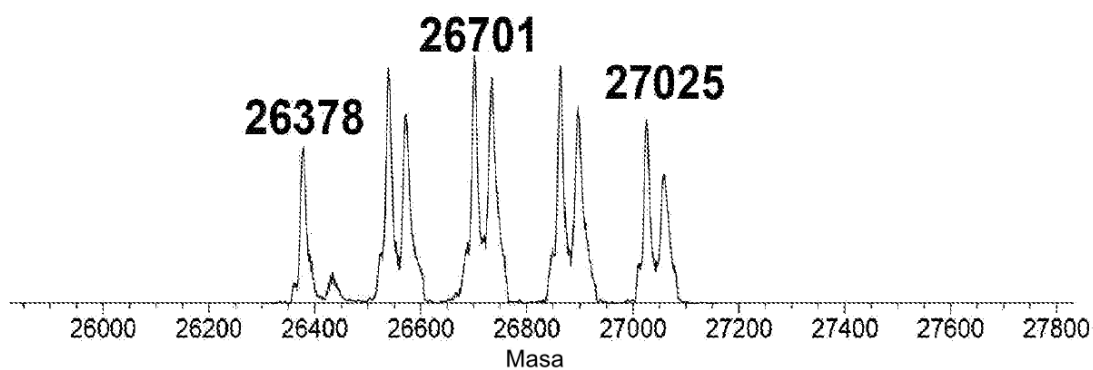


Fig. 16b

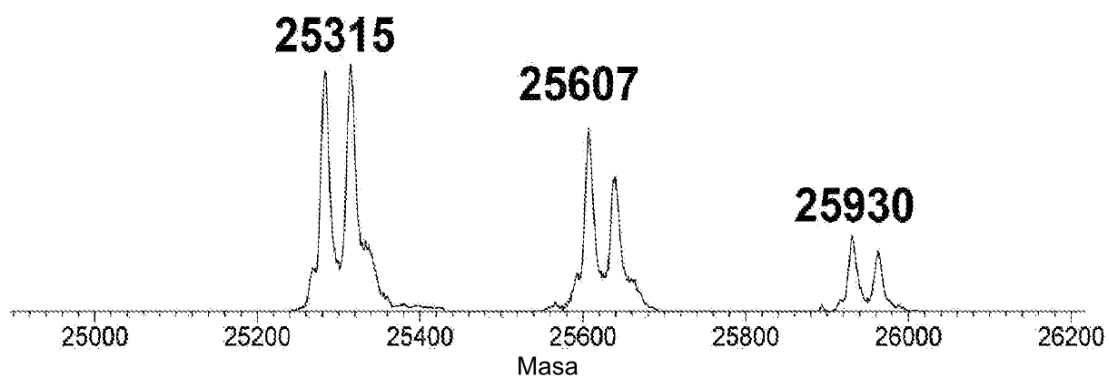


Fig. 16c

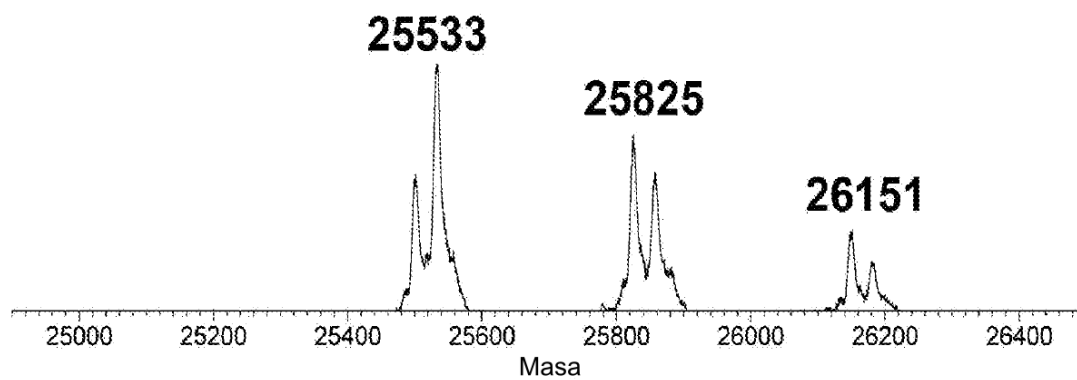


Fig. 17

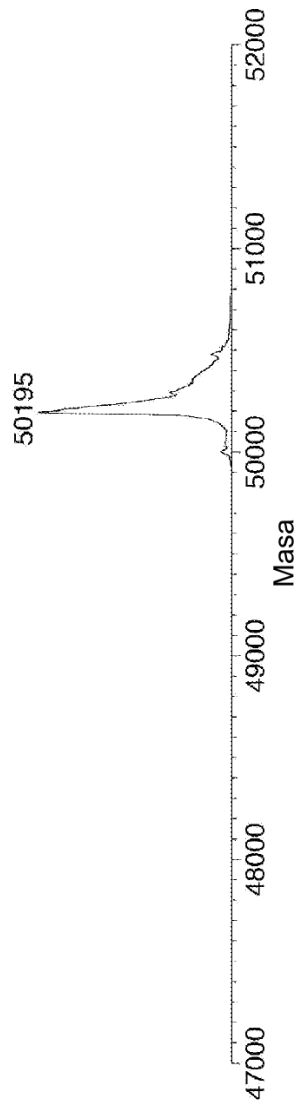


Fig. 18a

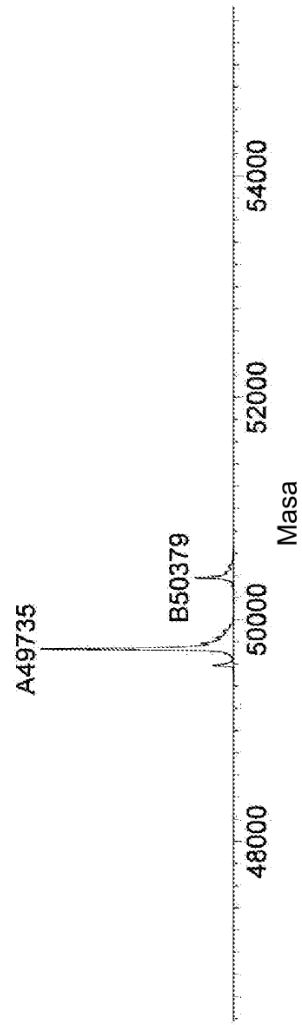
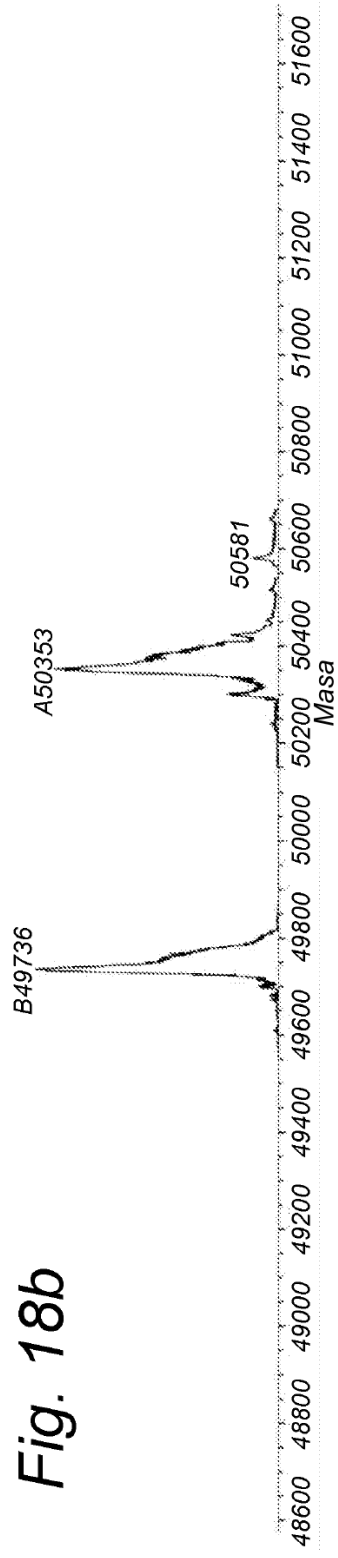


Fig. 18b



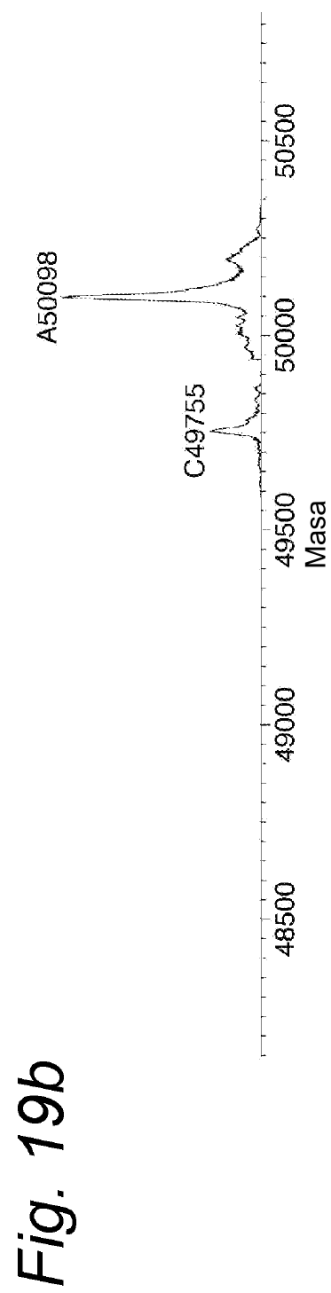
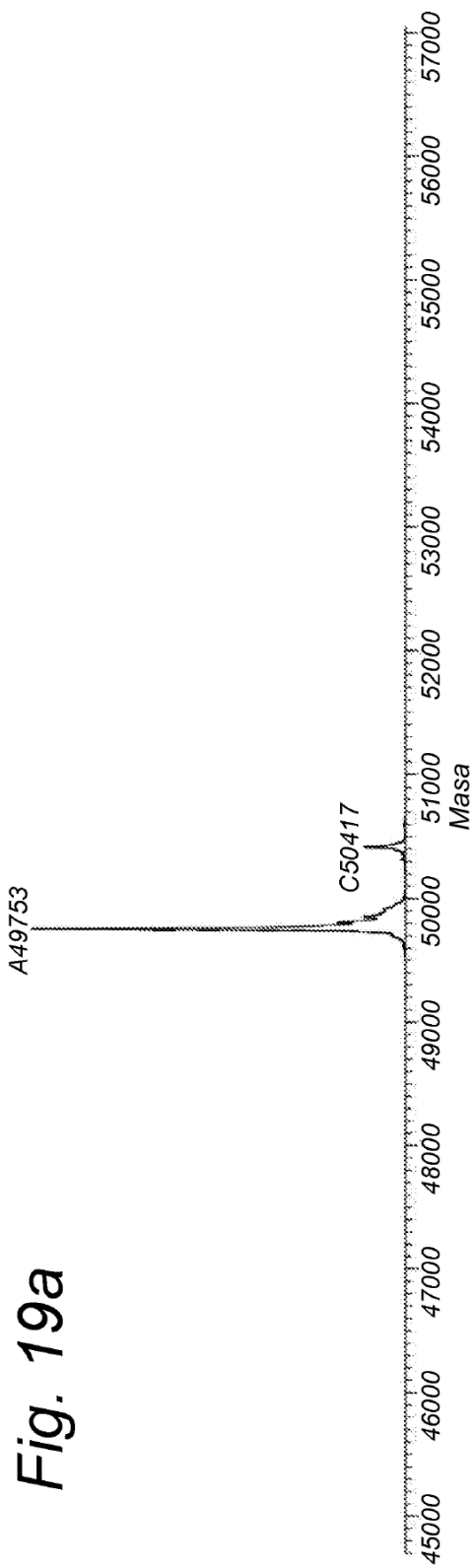


Fig. 20

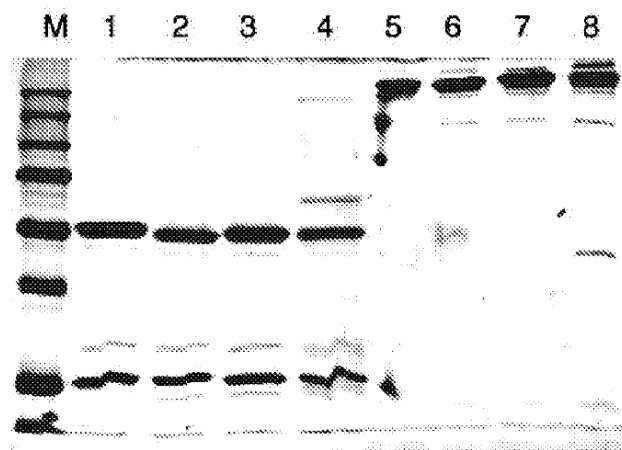


Fig. 21

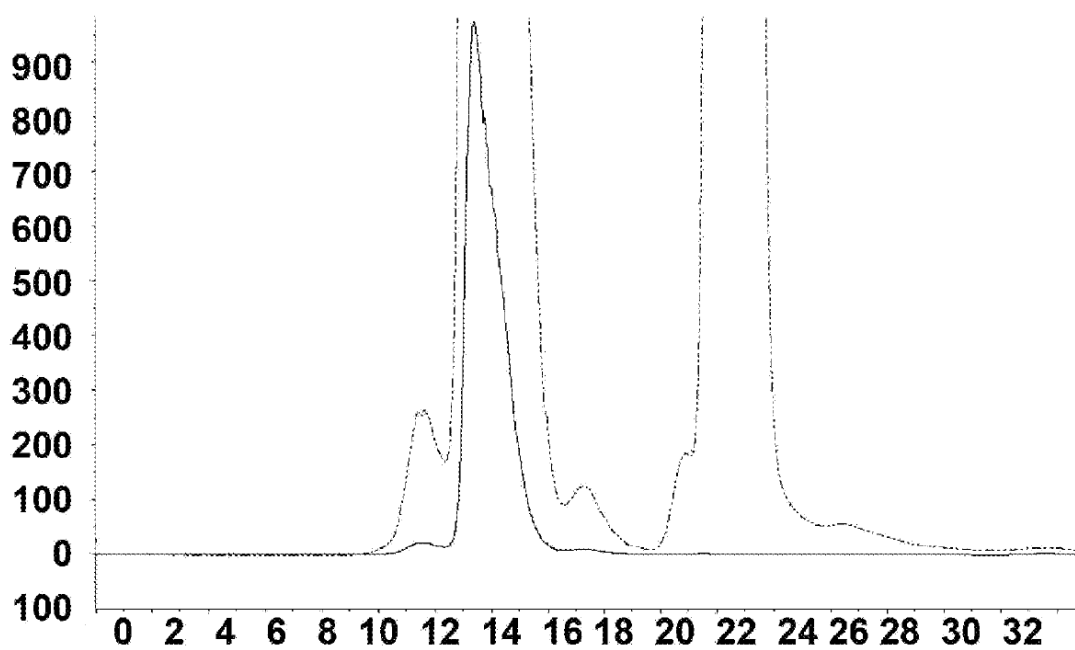


Fig. 22

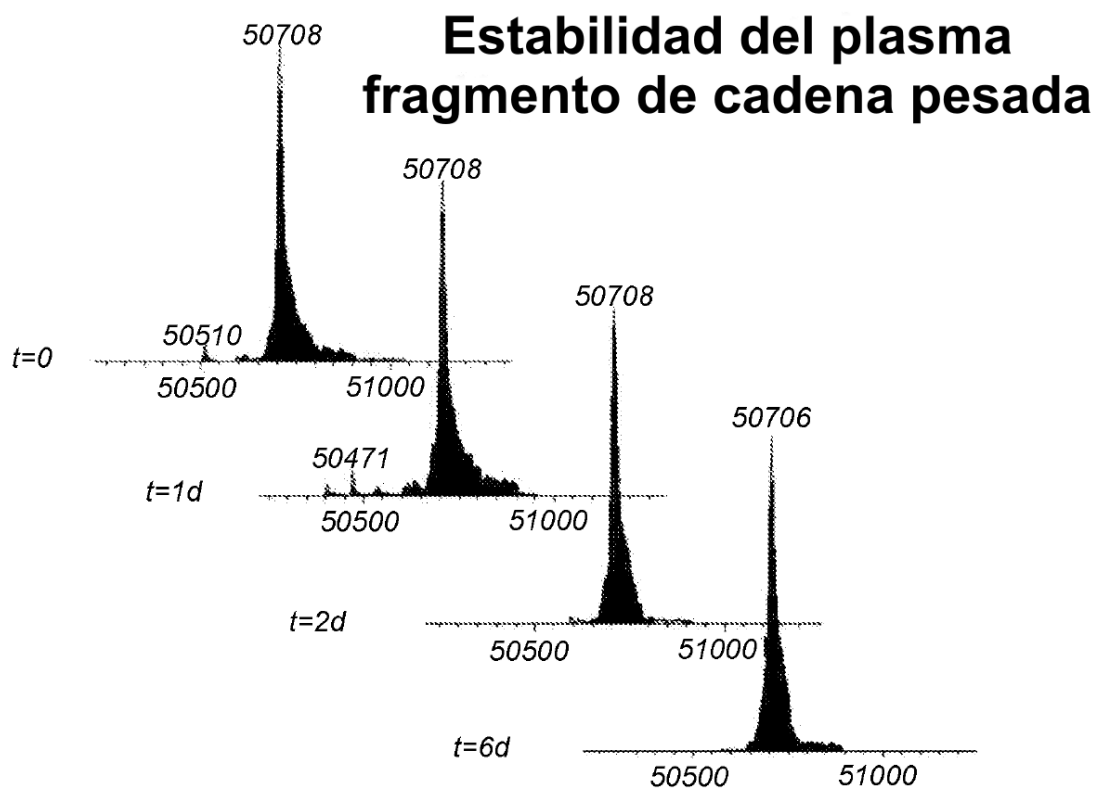


Fig. 23

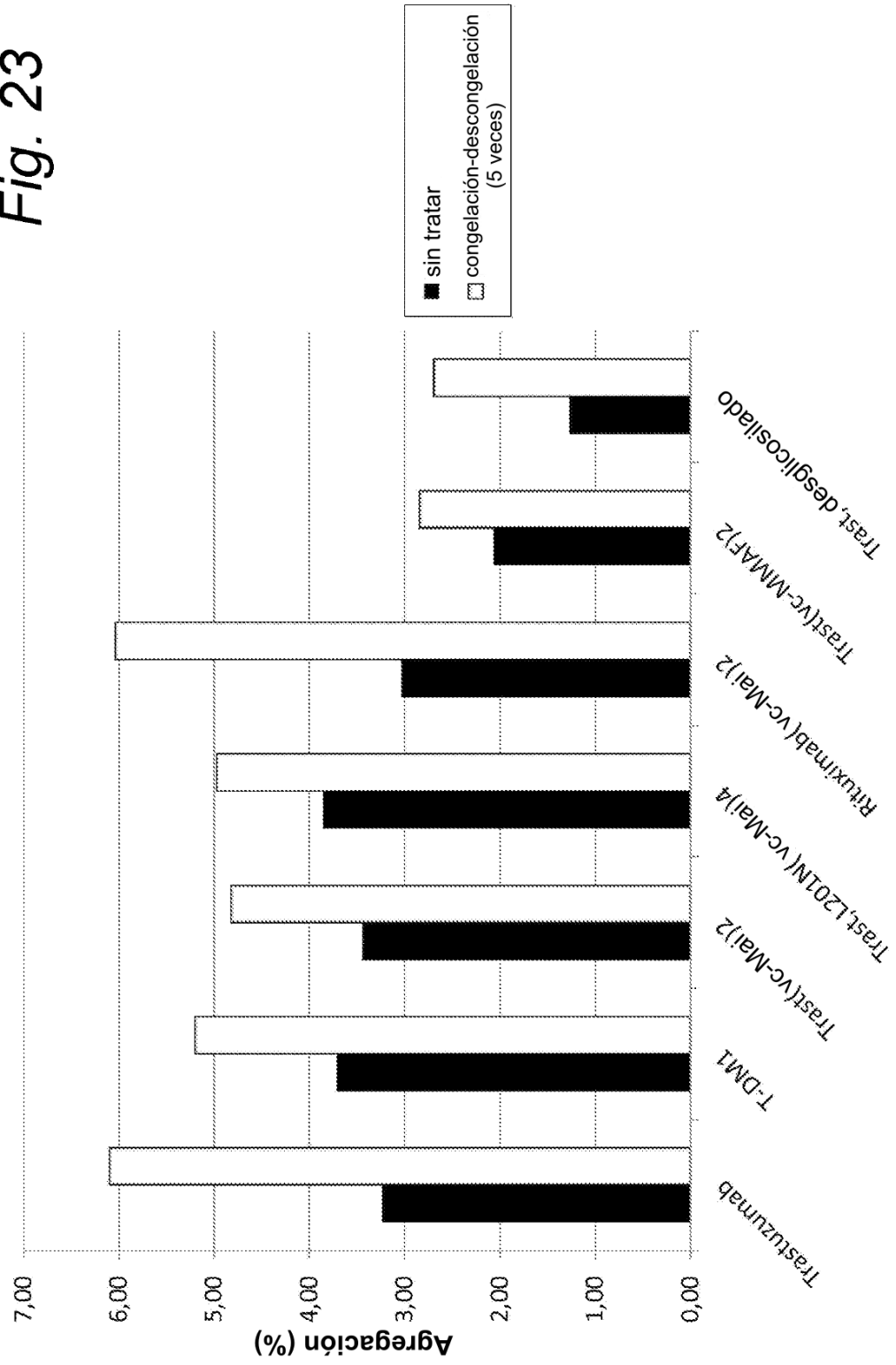


Fig. 24

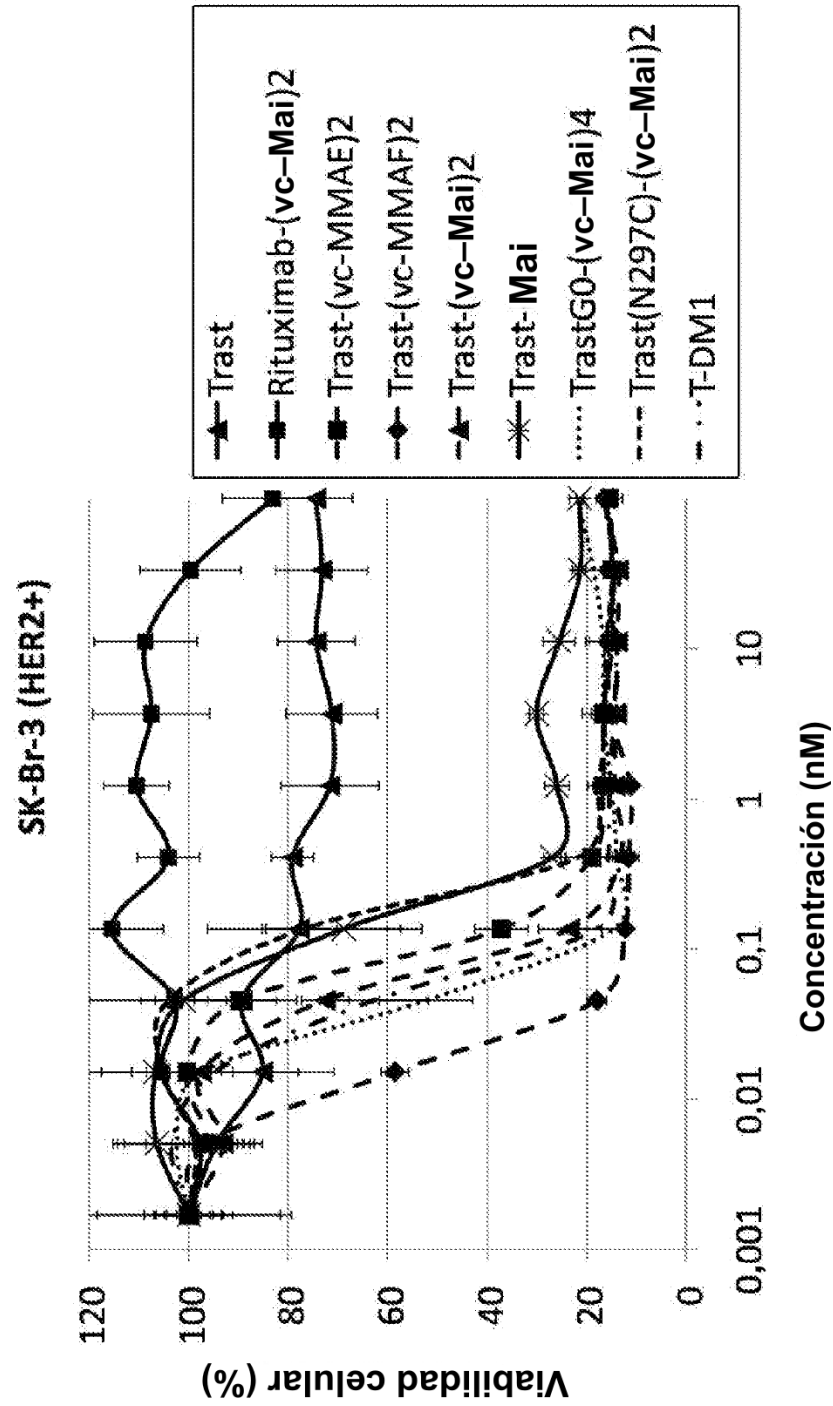


Fig. 25

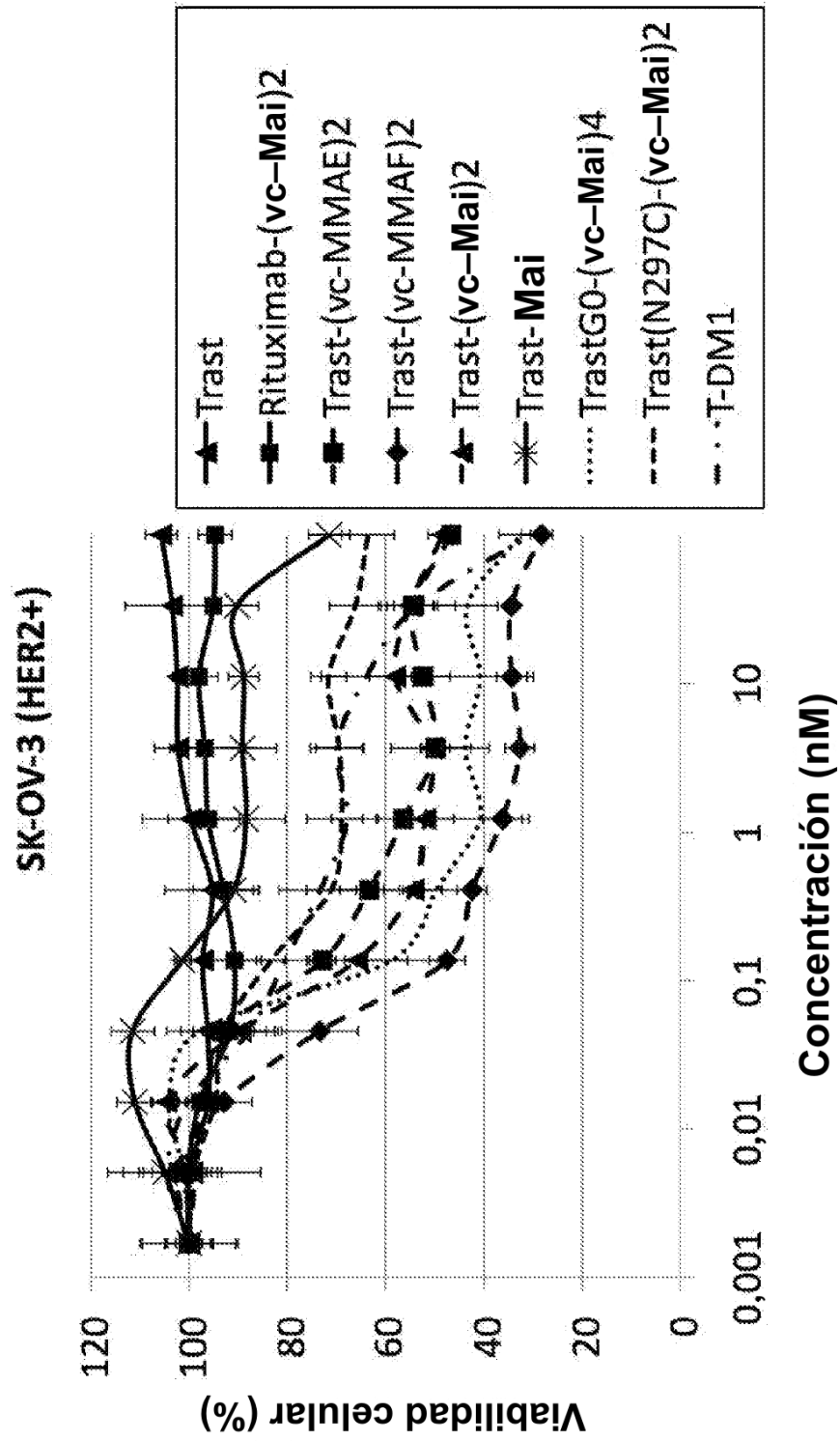
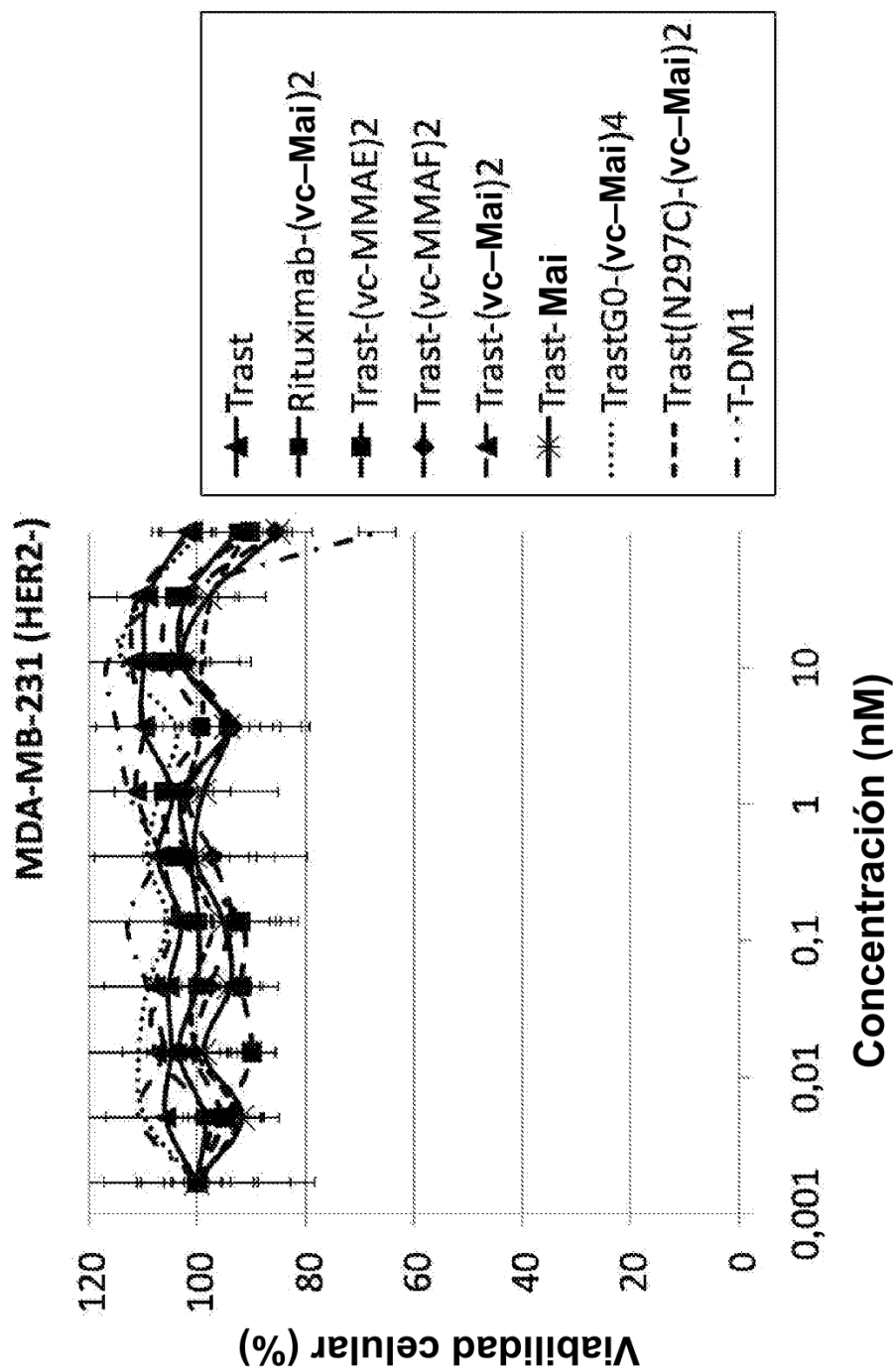
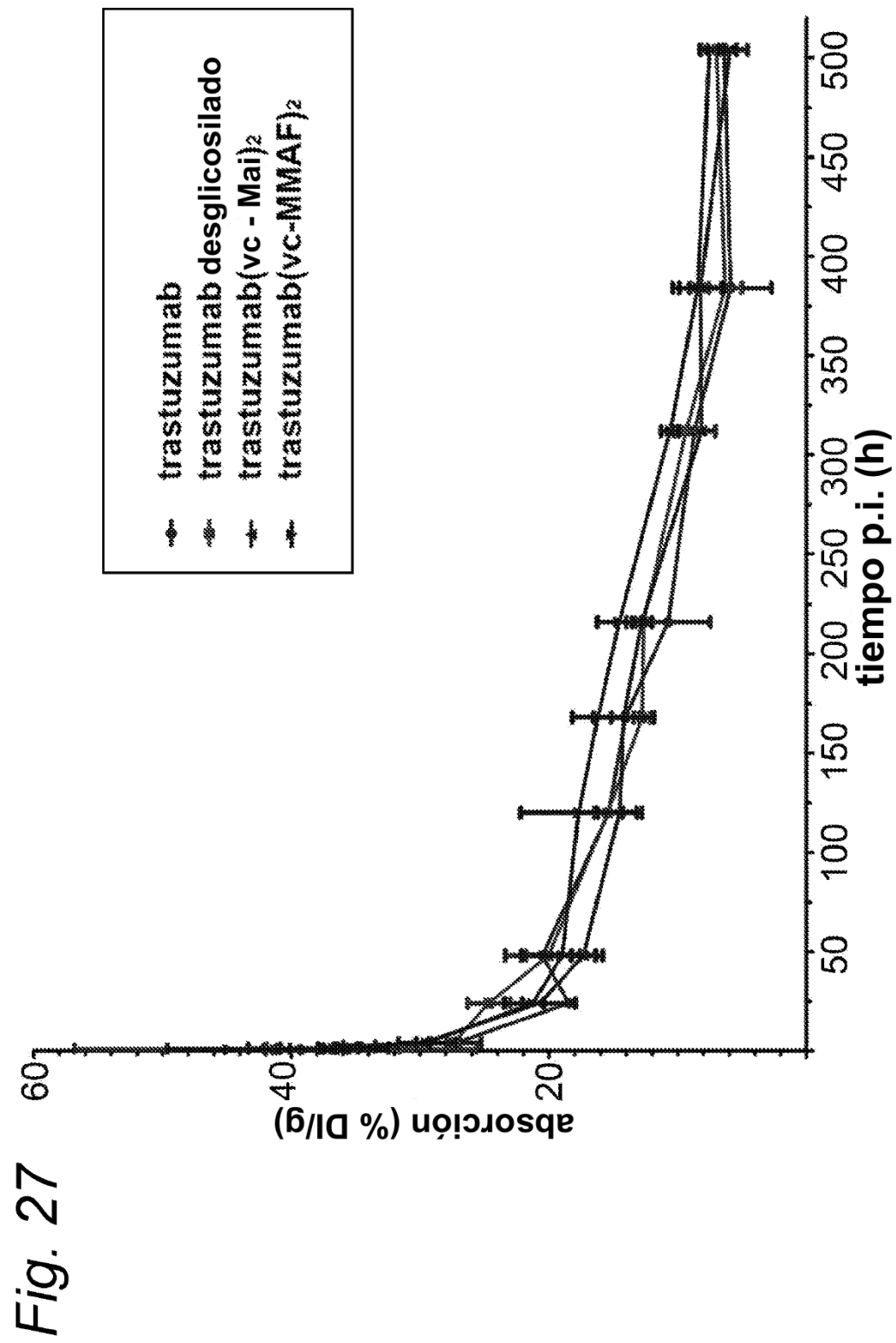
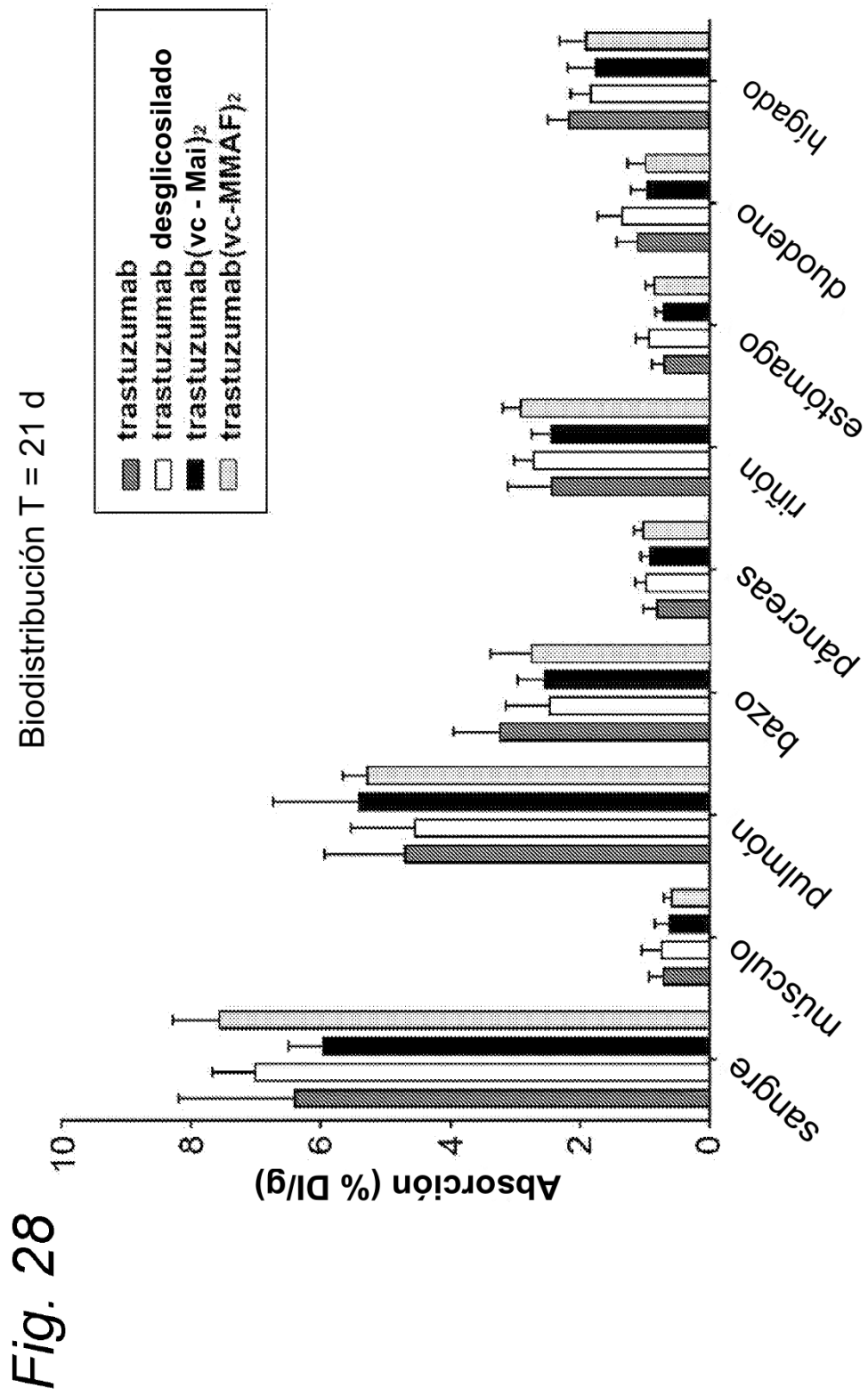


Fig. 26







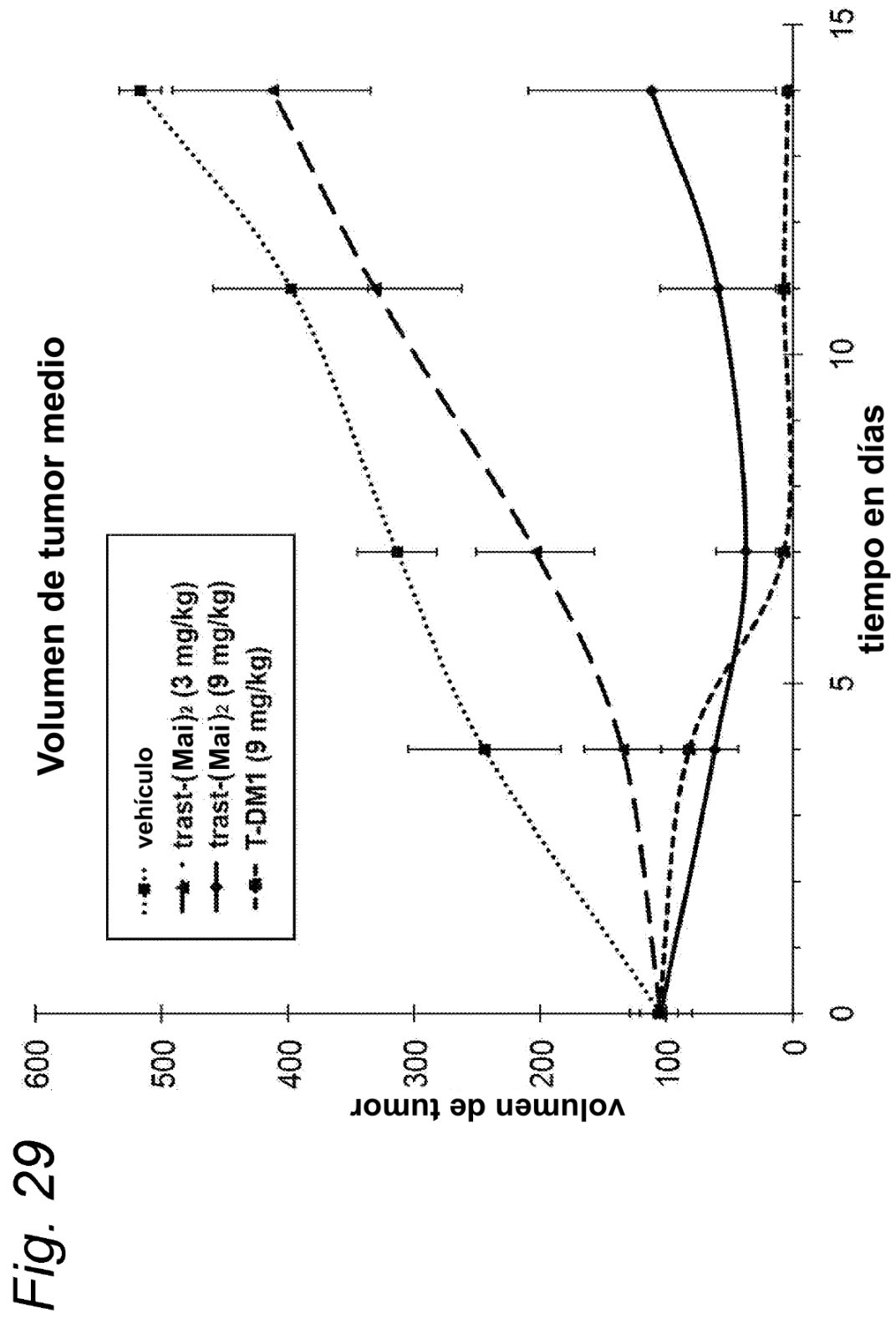


Fig. 30

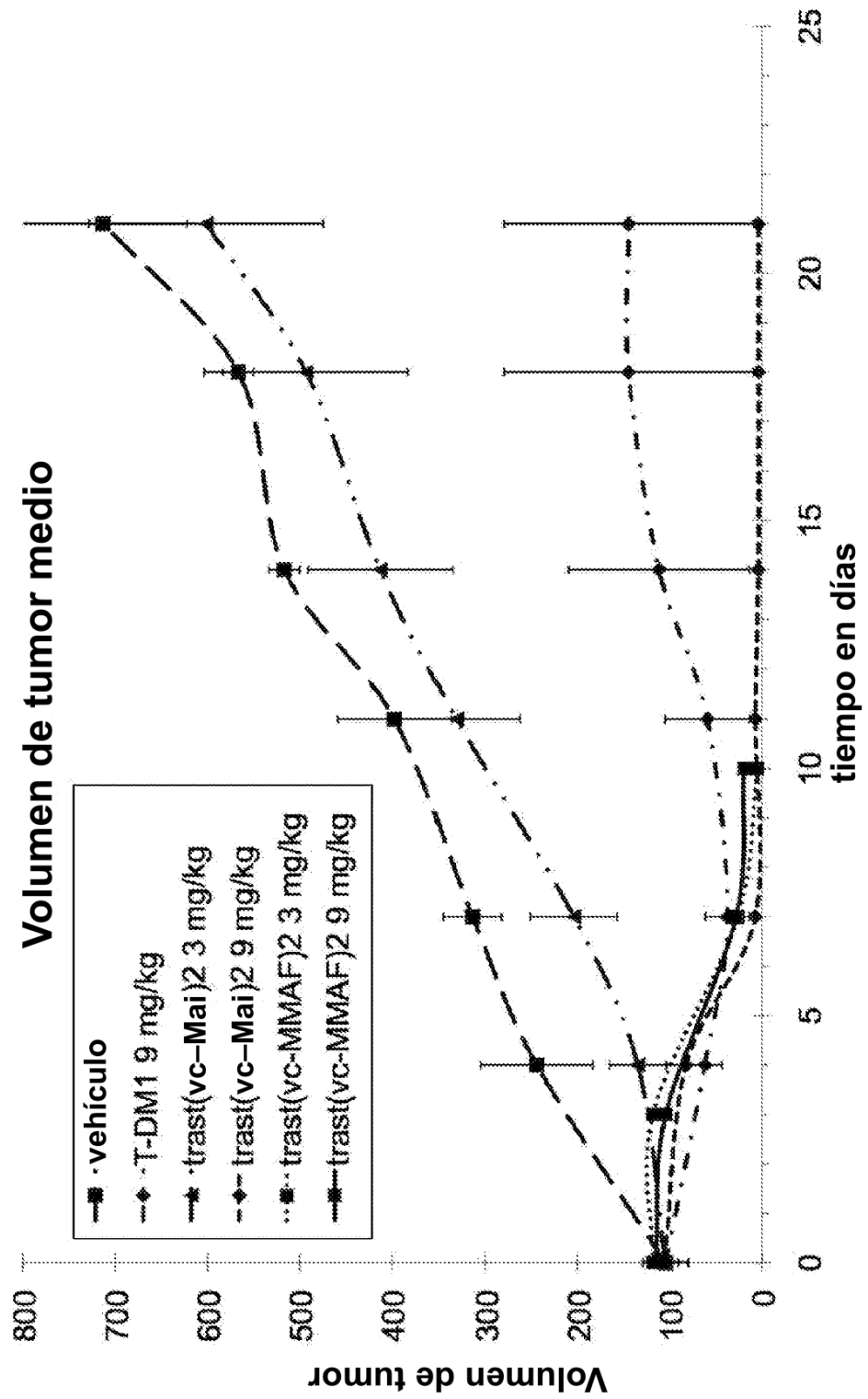


Fig. 31

