

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 503**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07H 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2014 PCT/FI2014/050322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014 E 14725209 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2991683**

54 Título: **Conjugados de una glicoproteína o un glicano con una carga útil tóxica**

30 Prioridad:

02.05.2013 FI 20135451
14.10.2013 FI 20136020

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2020

73 Titular/es:

GLYKOS FINLAND OY (100.0%)
Viiikinkaaari 6
00790 Helsinki, FI

72 Inventor/es:

SATOMAA, TERO;
HELIN, JARI y
EKHOLM, FILIP S.

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 759 503 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de una glicoproteína o un glicano con una carga útil tóxica

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, a un conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano, a un procedimiento para preparar el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, a una composición farmacéutica, a un procedimiento para modular el crecimiento de una población celular y a un procedimiento para tratar y/o modular el crecimiento y/o profilaxis de las células tumorales.

Antecedentes de la invención

10 Los conjugados de moléculas de carga útil tóxicas, tales como fármacos citotóxicos con proteínas, por ejemplo anticuerpos, pueden ser útiles, por ejemplo, en la terapia del cáncer. Los conjugados disponibles actualmente utilizan diversas reacciones químicas para conjugar moléculas de carga útil tóxicas con proteínas; sin embargo, muchos de ellos pueden no ser óptimos en términos de, por ejemplo, actividad de la molécula de carga útil tóxica, solubilidad acuosa del conjugado o las condiciones de reacción requeridas para la conjugación.

15 Por ejemplo, un conjugado voluminoso o un conjugado que tiene una solubilidad subóptima puede no administrarse eficientemente a su diana. Una molécula de carga útil tóxica no siempre se libera eficientemente de la proteína y/o se administra a las células o en varias partes de las células. La toxicidad de la molécula de carga tóxica se puede reducir como resultado de la conjugación. En algunos casos, la unión de la molécula de carga útil tóxica puede no ser estable frente a la degradación química o bioquímica durante la fabricación o en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en sangre, suero, plasma o tejidos. Además, la conjugación de la molécula de carga útil tóxica en una o
20 más posiciones aleatorias y/o grupos químicos de la proteína puede perjudicar las propiedades farmacocinéticas del conjugado o la especificidad de la proteína, tal como un anticuerpo, hacia su diana.

El documento WO 2009/006620 describe derivados del ácido oligosacárido, procedimientos de fabricación y usos inmunológicos.

25 El documento WO 2005/012484 describe conjugados en los que una toxina se une a un anticuerpo a través de un grupo de unión a glicosilo.

Staudacher et al., Glycoconjugate Journal 1992, 9, 82-85 describe la α 1-6(α 1-3)-difucosilación de la N-acetilglucosamina unida a asparagina en la fosfolipasa de veneno de abeja A2.

El documento WO 2007/011968 describe conjugados de fármacos ligandos que comprenden un ligador a base de β -glucurónido y procedimientos para usar tales compuestos.

30 El documento US 2007/027068 describe la remodelación y la glucoconjugación de la eritropoyetina.

El documento WO 97/34632 describe anticuerpos específicos de células B humanizadas glicosiladas.

El documento WO 2011/064303 describe compuestos sialoquiméricos.

El documento WO 2008/090151 describe compuestos antivirales.

35 El documento WO 2014/065661 describe anticuerpos modificados, conjugados de anticuerpos y procesos para su preparación.

Propósito de la invención

40 El propósito de la presente invención es proporcionar conjugados de molécula de carga útil tóxica para glicoproteína y conjugados de molécula de carga útil tóxica-glicano que tienen propiedades mejoradas en comparación con los conjugados conocidos y que retienen una alta actividad de la molécula de carga útil tóxica. El propósito de la presente invención también es proporcionar procedimientos para preparar los conjugados de la molécula de carga útil tóxica para la glicoproteína.

Sumario

El procedimiento para preparar un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con la presente invención se caracteriza por lo que se presenta en la reivindicación 1.

45 Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención y constituyen una

parte de esta memoria descriptiva, ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción, ayudan a explicar los principios de la invención. En los dibujos:

- 5 Figura 1 muestra la citotoxicidad *in vitro* de los derivados de dolastatina contra la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3 como % de viabilidad en comparación con las células de control (*eje y*) medidas a diferentes concentraciones de derivados en el medio (*eje x*). La numeración del compuesto es de acuerdo con el Ejemplo 1:1, monometilauristatina F (MMAF); 3,N-(6-O-propargil-D-galactosil)-MMAF; 5,N-(2-desoxi-D-glucosil)-MMAF; 8,N-[6-O-(β-D-galactopiranosil)-D-galactosil]-MMAF; 10,N-[4-O-[4-O-(α-D-galactopiranosil)-β-D-galactopiranosil]-D-glucosil]-MMAF; 11,N-[4-O-[3-O-(α-N-acetilneuraminil)-β-D-galactopiranosil]-D-glucosil]-MMAF(11);
- 10 Figura 2 muestra el análisis espectrométrico de masas MALDI-TOF de CMP-9-desoxi-9-azido-NeuAc purificado. El espectro muestra el producto como la señal principal en m/z 637 y CTP en m/z 479;
- Figura 3 muestra el análisis MALDI-TOF MS de N-glicano A) cetuximab, B) cetuximab digerido con α1,3-galactosidasa, C) cetuximab digerido con α1,3-galactosidasa y sialidasa A y D) cetuximab digerido con α1,3-galactosidasa, sialidasa A y β1,4-galactosidasa;
- 15 Figura 4 muestra el análisis de MALDI-TOF MS de N-glicanos de cetuximab digerido con α1, 3-galactosidasa y Sialidasa A y galactosilado con β1,4-galactosiltransferasa;
- Figura 5 demuestra el análisis de MALDI-TOF MS de la reacción de ST6Gal1 de cetuximab digerido con α1,3-galactosidasa-y Sialidasa A y galactosilado;
- 20 Figura 6 muestra el análisis de MALDI-TOF MS de N-glicanos de la región Fc de cetuximab digerido con Endo S;
- Figura 7 muestra el MALDI-TOF de Fc-glicanos de cetuximab tratados con Endo S β1-4-galactosilados;
- Figura 8 muestra el MALDI-TOF de Fc-glicanos tratados con Endo S β-1,4-galactosilados y α-2,6-sialilados de cetuximab;
- 25 Figura 9 demuestra el MALDI-TOF de A) Fc-glicanos de cetuximab y B) Fc-glicanos de cetuximab β-1,4-galactosilados y α-2,6-sialilados;
- Figura 10 muestra MALDI-TOF de Fc-glicanos de cetuximab tratados con Endo S β-1,4-galactosilados y α-2,6-sialilados oxidados;
- Figura 11 muestra MALDI-TOF de N-glicanos de cetuximab β-1,4-galactosilados y α-2,6-sialilados oxidados. A) MALDI reflector negativo, B) Reflector positivo;
- 30 Figura 12 demuestra el MALDI-TOF MS de cadenas livianas aisladas de MODO-AOAA-levulinil-cetuximab;
- Figura 13 muestra los espectros de MALDI-TOF de fragmentos Fc obtenidos de (A) MODO-ABAA-cetuximab y (B) MODO-ABAA-cetuximab-S; y
- Figura 14 muestra la citotoxicidad *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco en las células cancerosas.

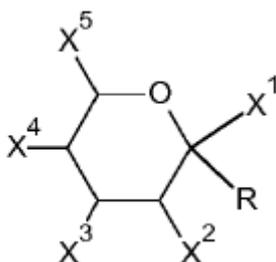
Descripción detallada de la invención

- 35 Se divulga un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína representado por la fórmula I



en la que

- Gp es una glicoproteína que comprende un N-glicano, en la que el N-glicano comprende un residuo de GlcNAc unido por una unión β-N a una asparagina;
- 40 n es un número entero de 1 a 20;
- D es una molécula de carga útil tóxica;
- L es un grupo ligador que une covalentemente G a D; y
- G es una estructura de sacárido representada por la fórmula II



Fórmula II

en la que

- 5 R es un enlace glicosídico al N-glicano o un enlace glicosídico al residuo de GlcNAc unido por una unión β -N a una asparagina;
- X¹ es H o carboxilo;
- X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L;
- 10 a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L; y
- a condición de que cuando X¹ es carboxilo, entonces X² es H, X³ es OH, X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido; R es un enlace glicosídico al N-glicano; y X⁴ es un enlace a L o X⁵ se une por medio de un enlace a L; o
- 15 cuando X¹ es H, entonces R es un enlace glicosídico al N-glicano o al residuo de GlcNAc unido por una unión β -N a una asparagina.

En este contexto, los términos "Neu5Ac", "NeuNAc" y "ácido neuramínico" se refieren al ácido N-acetilneuramínico; "Gal" se refiere a D-galactosa; "GlcNAc" se refiere a 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (N-acetil-D-glucosamina); "Fuc" se refiere a L-fucosa; "Glc" se refiere a D-glucosa; "Man" se refiere a D-manosa; "Hex" se refiere a hexosa;

20 "NeuGc" se refiere a ácido N-glicolil-neuramínico; y todos los residuos de monosacáridos están en forma de piranosa y azúcares D excepto L-fucosa a menos que se especifique lo contrario.

La notación de las estructuras de sacárido y los enlaces glicosídicos entre los residuos de sacárido usado en la presente memoria siguen a los comúnmente utilizados en la técnica, por ejemplo, "Gal β 4GlcNAc β " se debe entender que significa un residuo Gal unido por un enlace covalente entre el primer átomo de carbono del residuo Gal al

25 cuarto átomo de carbono del residuo N-acetilglucosamina unido por un átomo de oxígeno en la configuración beta, y que ambos residuos de monosacáridos están en forma de piranosa β -anomérica.

La nomenclatura de carbohidratos en la presente memoria está esencialmente de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (por ejemplo, Carbohydrate Res. 1998, 312, 167; Carbohydrate Res. 1997, 297, 1; Eur. J. Biochem. 1998, 257, 29).

- 30 La glicoproteína se puede referir a cualquier glicoproteína, siempre que comprenda al menos un N-glicano que comprende un residuo GlcNAc unido por una unión β -N a una asparagina de la glicoproteína. La glicoproteína se puede seleccionar en función de la unión selectiva que confiere para permitir la administración de la molécula de carga útil tóxica a células diana específicas

- 35 En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo. El anticuerpo se puede seleccionar en función de la unión selectiva que confiere para permitir la administración de la molécula de carga útil tóxica a células diana específicas. En una realización, la glicoproteína es capaz de unirse a una molécula diana.

En una realización, la molécula diana es un receptor y la glicoproteína es un ligando para el receptor. En una realización, la molécula diana es una molécula diana de cáncer.

- 40 En una realización, el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína se internaliza en una célula que expresa la molécula diana después de que el conjugado se une a la molécula diana. En otras palabras, después de unirse a su molécula diana en la célula diana, por ejemplo, en una célula tumoral, el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína se internaliza en la célula diana como resultado de la unión. El efecto de esto es que el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para la glicoproteína es captado por la célula diana.

Las moléculas diana o moléculas diana de cáncer (antígenos) para el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína puede incluir las proteínas CD, tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD8, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD25, CD26, CD30, CD33, CD34, CD37, CD38, CD40, CD44, CD46, CD52, CD56, CD79, CD105, y CD138; miembros de la familia del receptor ErbB, tales como receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2/neu), receptor HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, MacI, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, EpCAM, alfa4/beta7 integrina, y alfa v/beta3 integrina que incluyen sus subunidades alfa o beta; factores de crecimiento, tales como VEGF; factor tisular (TF); factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF); glicoproteína IIb/IIIa; TGF-beta; interferón alfa (alfa-IFN); una interleuquina, tal como IL-8; un receptor de interleuquina, tal como receptor de IL-2; IgE; virus sincitial respiratorio (RSV); glicoproteína de envoltura gp120 HIV-1, N-glicanos tipo de alta manosa asociados a cáncer; antígenos del grupo sanguíneo Apo2, receptor de muerte; receptor de flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; receptor de transferrina; estructura de glicano asociada con cáncer, tal como Lewis y o GD3; proteína C, etc.

En una realización, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD8, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD25, CD26, CD30, CD33, CD34, CD37, CD38, CD40, CD44, CD46, CD52, CD56, CD79, CD105, CD138, receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2/neu), receptor HER3 o HER4, LFA-1, MacI, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, EpCAM, alfa4/beta7 integrina, alfa v/beta3 integrina que incluye sus subunidades alfa o beta (por ejemplo anticuerpos anti-CDIIa, anti-CD18 o anti-CDIIb), factor tisular (TF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), glicoproteína IIb/IIIa, TGF-beta, interferón alfa (alfa-IFN), IL-8, receptor de IL-2, IgE, virus sincitial respiratorio (RSV), glicoproteína de envoltura gp120 HIV-1, N-glicanos tipo de alta manosa asociados a cáncer, antígenos del grupo sanguíneo Apo2, receptor de muerte, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptor mpl, CTLA-4, receptor de transferrina, Lewis y, GD3 y proteína C.

Los anticuerpos que se pueden usar son los anticuerpos para CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD79, CD105, CD138, EphA receptors (por ejemplo, receptor EphA2), receptores EphB, EGFr, EGFRvIII, HER2, HER3, trastuzumab, pertuzumab mesotelina, cripto, alfa beta6 integrina, VEGF, VEGFR, receptor de folato (por ejemplo, FOLR₁), receptor de transferrina, Lewis y, GD3, o EpCAM.

En una realización, la molécula diana es EGFR. En otras palabras, el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína es un conjugado de anti-EGFR.

En una realización, la molécula diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR) que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En una realización, la molécula diana es EGFR y la glicoproteína es EGF o un análogo de EGF capaz de unirse a EGFR.

Las enfermedades neoplásicas o los cánceres para cuyo tratamiento se pueden emplear los conjugados anti-EGFR de la invención son tumores que sobreexpresan EGFR, tumores del tracto respiratorio (por ejemplo, carcinomas parvicelulares y no parvicelulares, carcinoma bronquial), que incluyen preferiblemente carcinoma no parvicelular del pulmón; tumores de los órganos digestivos (por ejemplo, esófago, estómago, vesícula biliar, intestino delgado, intestino grueso, recto), que incluyen especialmente tumores intestinales; tumores de las glándulas endocrinas y exocrinas (por ejemplo, glándulas tiroideas y paratiroides, páncreas y glándulas salivales), que incluyen preferiblemente páncreas; tumores de la región de la cabeza y cuello (por ejemplo, laringe, hipofaringe, nasofaringe, orofaringe, labios, cavidad oral, lengua y esófago); y/o gliomas.

En una realización, la molécula diana es HER2 que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la glicoproteína es transferrina y la molécula diana es el receptor de transferrina.

En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.

En una realización, la glicoproteína es a recombinant anticuerpo o un fragmento del mismo.

En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo IgG o un fragmento del mismo.

El anticuerpo también puede ser por ejemplo, un scFv, un anticuerpo de dominio único, un Fv, un anticuerpo VHH, un diacuerpo, un diacuerpo en tándem, un Fab, un Fab 'o un F(ab)₂. Además, el anticuerpo o un fragmento del mismo puede estar presente en formas monovalentes mono-específicas, multivalentes mono-específicas, bivalentes mono-específicas o multivalentes multiespecíficas.

En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), CD20, CD22, receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2/neu), CD52, CD33, CD11a, glicoproteína IIb/IIIa, CD25, IgE, receptor de IL-2, Lewis y, HIV-1 glicoproteína de envoltura gp120, N-glicanos tipo de alta manosa

asociados a cáncer, o virus sincitial respiratorio (RSV). Sin embargo, estas dianas de anticuerpos se proporcionan solo como ejemplos, a los cuales no se limita la invención; una persona experta apreciará que la glicoproteína de la invención no está limitada a ningún anticuerpo particular o forma del mismo.

- 5 En una realización, la glicoproteína es el anticuerpo bevacizumab (disponible por ejemplo bajo la marca AVASTIN®), tositumomab (BEXXAR®), etanercept (ENBREL®), trastuzumab (HERCEPTIN®), adalimumab (HUMIRA®), alemtuzumab (CAMPATH®), gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG®), efalizumab (RAPTIVE®), rituximab (RITUXAN®), infliximab (REMICADE®), abciximab (REOPRO®), basiliximab (SIMULECT®), palivizumab (SYNAGIS®), omalizumab XOLAIR®, daclizumab (ZENAPAX®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®) o ibritumomab tiuxetano (ZEVALIN®).
- 10 En una realización, la glicoproteína es el anticuerpo bevacizumab, tositumomab, etanercept, trastuzumab, adalimumab, alemtuzumab, gemtuzumab ozogamicin, efalizumab, rituximab, infliximab, abciximab, basiliximab, palivizumab, omalizumab, daclizumab, cetuximab, panitumumab, epratuzumab, 2G12, lintuzumab, nimotuzumab, GCM011, GCM012 o ibritumomab tiuxetano, o sus anticuerpos de glicofoma en los que el anticuerpo de glicofoma de comprende uno o más sitios de N-glicosilación introducidos en la cadena liviana y/o pesada.
- 15 En una realización, la glicoproteína es el anticuerpo abagovomab, actoxumab, adecatumumab, afutuzumab, altumomab, amatuximab, anifrolumab, apolizumab, atinumab, atlizumab, atorolimumab, bapineuzumab, basiliximab, bavixumab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bezlotoxumab, bimagrumab, bivatumab, blinatumomab, blosozumab, brentuximab, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab, caplacizumab, capromab, carlumab, catumaxomab, CC49, cedelizumab, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab, conatumumab, concizumab, crenezumab, CR⁶261, dacetuzumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, drozitumab, duligotumab, dupilumab, dusigitumab, ecomeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, eldelumab, elotuzumab, elsilimumab, enavatuzumab, enlimomab, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolocumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimumab, farletuzumab, fasinumab, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimumab, gevokizumab, girentuximab, glembatumumab, golimumab, gomiliximab, guselkumab, ibalizumab, icrucumab, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab, intetumumab, inolimumab, inotuzumab, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lambrolizumab, lampalizumab, lembikizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lodelizumab, lorvotuzumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, margetuximab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metelimumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, mogamulizumab, morolimumab, motavizumab, moxetumomab, muromonab, namilumab, narnatumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimomab, nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, obinutuzumab, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, onartuzumab, oregovomab, orticumab, otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, panobacumab, parsatuzumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pentumomab, perakizumab, pertuzumab, pidilizumab, pinatuzumab, pintumomab, placulumab, po-latuzumab, ponzumab, priliximab, pritoxaximab, primumab, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab, secukinumab, seribantumab, setoxaximab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, siplizumab, sirukumab, solanezumab, solitomab, sonpizumab, sontuzumab, stamulumab, suvizumab, tabalumab, tacatuzumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab, tefibazumab, tenatumomab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tildrakizumab, tigatuzumab, tocilizumab, toralizumab, tovetumab, tralokinumab, TRBS07, tregalizumab, tremelimumab, tucotuzumab, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vantictumab, vapaliximab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimumab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, 2G12 (anti-HIV-1 glicoproteína de envoltura gp120), o zolimomab. Sin embargo, estos anticuerpos se proporcionan solo como ejemplos, a los cuales no se limita la invención; una persona experta apreciará que el anticuerpo de la invención no está limitado a ningún anticuerpo particular o forma del mismo.
- 50 En una realización, la glicoproteína es cetuximab.
- En una realización, cetuximab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 3 y 4. En una realización, se introducen sitios de N-glicosilación adicionales en la cadena pesada de cetuximab. En una realización, la cadena pesada de cetuximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en G161S, Q177N, L184N, S192N y L195N en SEQ ID NO: 3.
- 55 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de cetuximab. En una realización, la cadena liviana de cetuximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en R18N, L154S, Q160N, S174N, y T180N en la SEQ ID NO:4.
- En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR (o anticuerpo de glicofoma de cetuximab) comprende unos o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR (o anticuerpo de glicofoma de cetuximab) comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 3 o una o más mutaciones

ES 2 759 503 T3

seleccionadas del grupo de G161S, Q177N, L184N, S192N, y L195N en la SEQ ID NO: 3, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:4 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R18N, L154S, Q160N, S174N, y T180N en la SEQ ID NO: 4.

En una realización, la glicoproteína es trastuzumab.

- 5 En una realización, trastuzumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 5 y 6. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en cadena pesada de trastuzumab. En una realización, cadena pesada de trastuzumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G162S, Q178N, L185N, S193N, y/o L196N en la SEQ ID NO: 5.

- 10 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de trastuzumab. En una realización, la cadena liviana de trastuzumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R18N, L154S, Q160N, S174N, y/o T180N en la SEQ ID NO:6.

- 15 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-HER2 (o anticuerpo de glicofoma de trastuzumab) comprende unos o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-HER2 (o anticuerpo de glicofoma de trastuzumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G162S, Q178N, L185N, S193N, y L196N en la SEQ ID NO: 5, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:6 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R18N, L154S, Q160N, S174N, y T180N en la SEQ ID NO:6.

- 20 En una realización, el anticuerpo es rituximab. En una realización, rituximab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 7 y 8. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en cadena pesada de rituximab. En una realización, cadena pesada de rituximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, y/o L197N en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en cadena liviana de rituximab. En una realización, cadena liviana de rituximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: K18N, L153S, Q159N, S173N, y/o T179N en la SEQ ID NO:8.

- 25 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD20 (o anticuerpo de glicofoma de rituximab) comprende uno o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD20 (o anticuerpo de glicofoma de rituximab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 7 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, y L197N en la SEQ ID NO: 7, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:8 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de K18N, L153S, Q159N, S173N, y T179N en la SEQ ID NO:8.

- 30 En una realización, el anticuerpo es bevacizumab. En una realización, bevacizumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 9 y 10. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en cadena pesada de bevacizumab. En una realización, la cadena pesada de bevacizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G165S, Q181N, L188N, S196N, y/o L199N en la SEQ ID NO: 9.

- 35 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en cadena liviana de bevacizumab. En una realización, la cadena liviana de bevacizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R18N, L154S, Q160N, S174N, y/o T180N en la SEQ ID NO: 10.

- 40 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A (o anticuerpo de glicofoma de bevacizumab) comprende unos o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A (o anticuerpo de glicofoma de bevacizumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G165S, Q181N, L188N, S196N, y L199N en la SEQ ID NO: 9, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:10 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R18N, L154S, Q160N, S174N, y T180N en la SEQ ID NO: 10.

- 45 En una realización, el anticuerpo es tositumomab. En una realización, tositumomab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 11 y 12. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en cadena liviana de tositumomab. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en cadena pesada de tositumomab. En una realización, la cadena pesada de tositumomab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G159S, Q175N, L182N, S190N, y/o L193N en la SEQ ID NO: 11.

- 50 En una realización, cadena liviana de tositumomab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: K18N, L153S, Q159N, S173N, T179N en la SEQ ID NO: 12.

- 55 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD20 (o anticuerpo de glicofoma de tositumomab) comprende uno o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD20 (o anticuerpo de glicofoma de tositumomab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 11 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G159S, Q175N, L182N, S190N, y L193N en la SEQ ID NO: 11, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:12 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de K18N, L153S,

Q159N, S173N, y T179N en la SEQ ID NO: 12.

En una realización, el anticuerpo es etanercept. En una realización, etanercept tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13. En una realización, unos o más sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la secuencia de etanercept usando los procedimientos descriptos, por ejemplo, en el documento US2013/0084291.

5 En una realización, el anticuerpo es adalimumab. En una realización, adalimumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 14 y 15. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de adalimumab. En una realización, la cadena pesada de adalimumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, y/o L197N en la SEQ ID NO: 16.

10 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de adalimumab. En una realización, la cadena liviana de adalimumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R₁8N, L154S, Q160N, S174N, y/o T180N en la SEQ ID NO: 17.

15 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TNFA (o anticuerpo de glicofoma de adalimumab) comprende uno o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TNFA (o anticuerpo de glicofoma de adalimumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 16 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, y L197N en la SEQ ID NO: 16, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO: 17 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R₁8N, L154S, Q160N, S174N, y T180N en la SEQ ID NO: 17.

20 En una realización, el anticuerpo es alemtuzumab. En una realización, alemtuzumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 18 y 19. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de alemtuzumab. En una realización, la cadena pesada de alemtuzumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: A91N, G165S, Q179N, L186N, S194N, L197N, y SEQ ID NO: 18.

En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de alemtuzumab. En una realización, la cadena liviana de alemtuzumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R₁8N, L154S, 35 Q160N, S174N, y/o T180N en la SEQ ID NO: 19.

25 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD52 (o anticuerpo de glicofoma de alemtuzumab) comprende uno o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD52 (o anticuerpo de glicofoma de alemtuzumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 18 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de A91N, G165S, Q179N, L186N, S194N, y L197N en la SEQ ID NO: 18, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO: 19 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R₁8N, L154S, Q160N, S174N, y T180N en la SEQ ID NO: 19.

30 En una realización, el anticuerpo es efalizumab. En una realización, efalizumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 20 y 21. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de efalizumab. En una realización, la cadena pesada de efalizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, y/o L197N en la SEQ ID NO: 20.

35 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de efalizumab. En una realización, la cadena liviana de efalizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R₁8N, L154S, Q160N, S174N, y/o T180N en la SEQ ID NO: 21.

40 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD11a (o anticuerpo de glicofoma de efalizumab) comprende unos o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD11a (o anticuerpo de glicofoma de efalizumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 20 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, L197N, y SEQ ID NO: 20, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO: 21 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R₁8N, L154S, Q160N, S174N, T180N, y SEQ ID NO: 21.

45 En una realización, el anticuerpo es infliximab. En una realización, infliximab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 22 y 23. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de infliximab. En una realización, la cadena pesada de infliximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E91N, sustitución de G a S en aproximadamente el aminoácido 161 (en la secuencia NSG), Q a N en aproximadamente el aminoácido 177 (en la secuencia QSS), L a N en aproximadamente el aminoácido 184 (en la secuencia LSS), S a N en aproximadamente el aminoácido 192 (en la secuencia SSS), y/o L a N en aproximadamente el aminoácido 195 (en la secuencia LGT) en la secuencia de la cadena pesada de infliximab.

50 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de infliximab. En una realización, la cadena liviana de infliximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R₁8N, sustitución de L a S en aproximadamente el aminoácido 154 (en la secuencia NAL), sustitución de Q a N en aproximadamente el aminoácido 160 (en la secuencia QES), sustitución de S a N en aproximadamente el aminoácido 174 (secuencia SLS→ NLS), sustitución de T N en aproximadamente el aminoácido 180 (en la secuencia TLS) de la secuencia de cadena liviana liviana de infliximab.

- 5 En una realización, el anticuerpo es basiliximab. En una realización, basiliximab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 24 y 25. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de basiliximab. En una realización, la cadena pesada de basiliximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E87N, G157S, Q173N, L180N, S188N, y/o L191N en la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26.
- En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de basiliximab. En una realización, la cadena liviana de basiliximab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: K18N, L151S, Q157N, S171N, T177N en la SEQ ID NO: 25.
- 10 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD25 (o secuencia de la cadena pesada de basiliximab) comprende unos o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD25 (o secuencia de la cadena pesada de basiliximab) comprende una cadena pesada que comprende las SEQ ID NOs: 24 o 26, o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E87N, G157S, Q173N, L180N, S188N, y L191N en la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:25 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de K18N, L151S, Q157N, S171N, y T177N en la SEQ ID NO: 25.
- 15 En una realización, el anticuerpo es omalizumab. En una realización, omalizumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 27 y 28. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de omalizumab. En una realización, la cadena pesada de omalizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, y L197N en la SEQ ID NO: 27.
- 20 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de omalizumab. En una realización, la cadena liviana de omalizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R18N, L158S, Q164N, S178N, y T184N en la SEQ ID NO: 28.
- En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-IgE (o secuencia de la cadena pesada de omalizumab) comprende uno o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-IgE (o secuencia de la cadena pesada de omalizumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 27 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G163S, Q179N, L186N, S194N, y L197N en la SEQ ID NO: 27, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:28 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R18N, L158S, Q164N, S178N, y T184N en la SEQ ID NO: 28.
- 25 En una realización, el anticuerpo es daclizumab. En una realización, daclizumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 29 y 30. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de daclizumab. En una realización, la cadena pesada de daclizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E74N, E89N, G158S, Q174N, L181N, S189N, y/o L192N en las SEQ ID NOs: 29.
- 30 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de daclizumab. En una realización, la cadena liviana de daclizumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R18N, L153S, Q159N, S173N, y/o T179N en la SEQ ID NO: 30.
- 35 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD25 (o secuencia de la cadena pesada de daclizumab) comprende uno o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD25 (o secuencia de la cadena pesada de daclizumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 29 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E74N, E89N, G158S, Q174N, L181N, S189N, y L192N en la SEQ ID NO: 29, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:30 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R18N, L153S, Q159N, S173N, y T179N en la SEQ ID NO: 30.
- 40 En una realización, el anticuerpo es nimotuzumab. En una realización, nimotuzumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 31 y 32. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de nimotuzumab para generar una nueva secuencia del anticuerpo anti-EGFR. En una realización, la cadena pesada del nuevo anti-EGFR comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E74N, E89N, G165S, Q181N, L188N, S196N, y/o L199N en la SEQ ID NO: 31.
- 45 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de nimotuzumab para generar una nueva secuencia del anticuerpo anti-EGFR. En una realización, la nueva cadena liviana de anti-EGFR cadena liviana comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: L159S, Q165N, S179N, y/o T185N en la SEQ ID NO: 32. En una realización, la nueva cadena liviana d anti-EGFR comprende la sustitución R a N en el aminoácido 18 de la SEQ ID NO:32.
- 50 En algunas realizaciones, el nuevo anticuerpo anti-EGFR comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 31 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E74N, E89N, G165S, Q181N, L188N, S196N, y L199N en la SEQ ID NO: 31, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:32 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R18N, L159S, Q165N, S179N, y T185N en la SEQ ID NO: 32.
- 55 En una realización, el nuevo anticuerpo anti-EGFR es GCM012 que comprende las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 33.

- En una realización, el anticuerpo es epratuzumab. En una realización, epratuzumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 34 y 35. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de epratuzumab. En una realización, la cadena pesada de epratuzumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E74N, E89N, G158S, Q174N, L181N, S189N, y/o L192N en la SEQ ID NO: 34.
- 5 En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de epratuzumab. En una realización, la cadena liviana de epratuzumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: L159S, Q165N, S179N, y/o T185N en la SEQ ID NO: 35.
- En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD22 (o anticuerpo de glicofoma de epratuzumab) comprende unos o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD22 (o anticuerpo de glicofoma de epratuzumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 34 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E74N, E89N, G158S, Q174N, L181N, S189N, y L192N en la SEQ ID NO: 34, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:35 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de L159S, Q165N, S179N, y T185N en la SEQ ID NO: 35.
- 10
- En una realización, el anticuerpo es lintuzumab. En una realización, lintuzumab tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 36 y 37. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la la cadena pesada de lintuzumab cadena pesada comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G158S, Q174N, L181N, S189N, y/o L192N en la SEQ ID NO: 36.
- 15
- En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena liviana de lintuzumab. En una realización, la cadena liviana de lintuzumab comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: R₁8N, L157S, Q163N, S177N, y/o T183N en la SEQ ID NO: 37.
- 20
- En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD33 (o anticuerpo de glicofoma de lintuzumab) que comprende sitios de N-glicosilación adicionales. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD33 que comprende sitios de N-glicosilación adicionales en comparación con el correspondiente anticuerpo anti-CD33 humano o humanizado. En una realización, el anticuerpo anti-CD33 es GCM011 que tiene una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (o anticuerpo de glicofoma de lintuzumab) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 36 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G158S, Q174N, L181N, S189N, y L192N en la SEQ ID NO: 36, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO:37 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de R₁8N, L157S, Q163N, S177N, y T183N en la SEQ ID NO: 37.
- 25
- En una realización, la cadena pesada de lintuzumab comprende la sustitución E a N en el aminoácido 74 de la SEQ ID NO:36. En una realización, el anticuerpo anti-CD33 es GCM011 que comprende las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO:37. En una realización, un anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 38 y la sustitución R a N en el aminoácido de la SEQ ID NO: 37. En una realización, el anticuerpo es 2G12. En una realización, 2G12 tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 39 y 40. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de 2G12 cadena liviana. En una realización, 2G12 cadena liviana comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: T18N, L154S, Q160N S174N y/o T180N en la SEQ ID NO: 39.
- 30
- 35
- En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se introducen en la cadena pesada de 2G12. En una realización, la cadena pesada de 2G12 comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo de: E89N, G165S, Q181N, L188N, S196N, y/o L199N en la SEQ ID NO: 40.
- 40
- En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-manosa (o la cadena pesada de2G12) comprende unos o más sitios de N-glicosilación adicionales. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-manosa (o la cadena pesada de2G12) comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 40 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de E89N, G165S, Q181N, L188N, S196N, y L199N en la SEQ ID NO: 40, y una cadena liviana que comprende la SEQ ID NO: 39 o una o más mutaciones seleccionadas del grupo de T18N, L154S, Q160N, S174N, y T180N en la SEQ ID NO: 39.
- 45
- En una realización, el anticuerpo es ibritumomab tiuxetan. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se pueden introducir en las cadenas pesada y/o liviana descritas anteriormente, por ejemplo, para el anticuerpo lintuzumab.
- 50
- En una realización, el anticuerpo es panitumumab. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se pueden introducir en las cadenas pesada y/o liviana descritas anteriormente, por ejemplo, para el anticuerpo lintuzumab.
- En una realización, el anticuerpo es gemtuzumab ozogamicina. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se pueden introducir en las cadenas pesada y/o liviana descritas anteriormente, por ejemplo, para el anticuerpo lintuzumab.
- 55
-] En una realización, el anticuerpo es abciximab. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se

- pueden introducir en las cadenas pesada y/o liviana descritas anteriormente, por ejemplo, para el anticuerpo lintuzumab.
- En una realización, el anticuerpo es palivizumab. En una realización, los sitios de N-glicosilación adicionales se pueden introducir en las cadenas pesada y/o liviana descritas anteriormente, por ejemplo, para el anticuerpo lintuzumab.
- El N-glicano se puede unir a varias posiciones en la glicoproteína.
- En las realizaciones en las que la glicoproteína es un anticuerpo, el N-glicano se puede unir a varias posiciones en el anticuerpo.
- En una realización, el N-glicano se une a un sitio en que la glicoproteína o el anticuerpo están glicosilados naturalmente.
- En una realización, el N-glicano se une al dominio Fc del anticuerpo.
- El dominio Fc de las moléculas de IgG comprende un sitio único para la glicosilación unida a N dentro de su dominio CH₂ en un residuo de asparagina 297 (Asn297) numerado de acuerdo con el índice EU (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Típicamente, las estructuras de oligosacáridos unidas al dominio Fc comprenden cadenas biantenarias con galactosilación, sialilación y fucosilación variables.
- En una realización, el N-glicano se une a un sitio en el dominio variable del anticuerpo.
- En una realización, el anticuerpo es cetuximab y el N-glicano se une a la cadena pesada del residuo de asparagina en el dominio variable.
- En una realización, la glicoproteína comprende al menos uno o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4 sitios de N-glicosilación.
- En una realización, la glicoproteína comprende al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4, o 1-2 N-glicanos.
- En una realización, la glicoproteína se manipula genéticamente para comprender uno o más sitios de N-glicosilación adicionales. Dichos sitios de N-glicosilación adicionales pueden estar en sitios que son accesibles para el disolvente y a una distancia de los sitios de unión a antígeno o unión a receptor de la glicoproteína o anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal. Dichos sitios se manipulan genéticamente para comprender la secuencia consenso de N-glicosilación Asn-Xaa-Ser/Thr, en la que Xaa es cualquier aminoácido codificado en el código genético humano, excepto que Xaa ≠Pro.
- En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo manipulado genéticamente para comprender unos o más sitios de N-glicosilación adicionales en el dominio Fc.
- En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo manipulado genéticamente para comprender uno o más sitios de N-glicosilación adicionales en la región variable.
- En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo manipulado genéticamente para comprender unos o más sitios de N-glicosilación adicionales en una región diferente del dominio Fc y la región variable.
- En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo que se puede modificar mediante la adición, supresión, o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos para introducir uno o más sitios de glicosilación unidos a N, de este modo se produce un "anticuerpo de glicofoma". Los sitios de N-glicosilación adicionales se pueden manipular genéticamente en las cadenas livianas y pesadas por los procedimientos descritos en, por ejemplo, WO₉₇/34632 y/o WO₉₅/15769. En el documento WO₉₇/34632, los sitios de N-glicosilación adicionales pueden ser los descritos en la Fig 12 y correspondientes a HCN1, HCN2, HCN₃, HCN4, y/o HCN5 para la cadena pesada, y KCN1, KCN2, KCN₃, y/o KCN4 para la cadena liviana kappa. Los sitios de N-glicosilación adicionales en el anticuerpo significan uno o más sitios de N-glicosilación no Asn297. Los sitios de N-glicosilación no Asn297 pueden existir o se pueden introducir en una cadena pesada y/o liviana.
- En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo manipulado genéticamente para comprender al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4 sitios de N-glicosilación adicionales.
- En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo manipulado genéticamente para comprender al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4 sitios de N-glicosilación no Asn297 adicionales.
- En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo que se manipula genéticamente para comprender unos o más

sitios de N-glicosilación adicionales que el correspondiente anticuerpo humano o humanizado. En este contexto, el correspondiente anticuerpo humano o humanizado se debe entender que se refiere al anticuerpo humano o humanizado que no se ha manipulado genéticamente para comprender unos o más sitios de N-glicosilación adicionales.

- 5 En una realización, la glicoproteína es un anticuerpo que comprende uno o más N-glicanos adicionales que el correspondiente anticuerpo humano o humanizado. Una persona experta entenderá que la adición de uno o más sitios de N-glicosilación adicionales no siempre produce que uno o más N-glicanos adicionales se incorporan a la glicoproteína. Tales uno o más sitios adicionales de N-glicosilación no siempre están glicosilados. En otras palabras, si la glicoproteína comprende varios sitios de glicosilación, el número de moléculas de carga útil tóxicas o de carga de moléculas de carga útil tóxicas ("relación fármaco/anticuerpo" cuando la glicoproteína es un anticuerpo) (n en la fórmula I) puede ser igual o menor que el número de sitios de glicosilación.

En consecuencia, en una realización, el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína está representado por la fórmula I, en la que la glicoproteína comprende m sitios de glicosilación en la glicoproteína, y $n \geq m$.

- 15 En una realización, el número de sitios de glicosilación en la glicoproteína es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4; y n es menor que o igual al número de sitios de glicosilación.

- En una realización, el número de sitios de glicosilación en la glicoproteína es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4; y n es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4.

- 20 En una realización, unos o más sitios de N-glicosilación adicionales, en particular sitios no Asn297, pueden estar todos o casi todos glicosilados. En otras palabras, si la glicoproteína comprende varios sitios de glicosilación, el número de moléculas de carga útil tóxicas (n en la fórmula I) puede ser igual o mayor que el número de sitios de glicosilación

- 25 En consecuencia, en una realización, el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína está representado por la fórmula I, en la que la glicoproteína comprende m sitios de glicosilación en la glicoproteína, y $n \leq m$.

- En una realización, el número de sitios de glicosilación en la glicoproteína es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4; y n es mayor o igual al número de sitios de glicosilación.

- 30 En una realización, el número de sitios de glicosilación en la glicoproteína es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4; y n es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4.

- 35 En una realización, el número de sitios de glicosilación no Asn297 en la glicoproteína es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4; y n es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4. En una realización, el número de sitios de glicosilación que no son Asn297 en la glicoproteína es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4; y n es al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o 1-6, o 2-5, o 3-4. La de moléculas de carga útil tóxica, es decir, n , puede variar de 1 a aproximadamente 20 restos de carga útil (D) por glicoproteína o anticuerpo. El número promedio de restos de carga útil tóxicos por glicoproteína o anticuerpo en preparaciones de ADC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas y ensayo ELISA. También se puede determinar La distribución cuantitativa de ADC en términos de n . En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneo donde n es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco se puede lograr por medios tales como la electroforesis.

- 45 Para los conjugados de la molécula de carga útil tóxica para la glicoproteína, n está limitado por el número de sitios de N-glicosilación y "antenas" de N-glicano por un N-glicano en la glicoproteína o el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un N-glicano biantenarico en Asn297, el anticuerpo puede tener uno, dos, tres o cuatro grupos de carbohidratos a través de los cuales se puede unir a un ligador o estructura de sacárido. Por otro lado, cuando se introduce un sitio de N-glicosilación adicional (sitio no Asn297) en el anticuerpo (por ejemplo, R/K18N en la cadena liviana), el anticuerpo puede tener tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más grupos de carbohidratos a través de los cuales se puede unir un ligador o estructura de sacárido además del N-glicano biantenarico en Asn297. En esta realización, n es aproximadamente 8, mayor que 8, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.

En un ejemplo, el N-glicano es un N-glicano es multiantenarico que comprende al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis antenas de N-glicano. En un ejemplo, el N-glicano en un sitio de glicosilación no

Asn297 en la glicoproteína es un N-glicano es multiantenarario. En un ejemplo, el N-glicano es un N-glicano con estructura de sacárido ramificado tales como estructura de N-acetilactosamina ramificada que comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis ramas de la estructura de sacárido. En una realización, el N-glicano en un sitio de glicosilación no Asn297 en la glicoproteína es un N-glicano con estructura de sacárido ramificada. En estos ejemplos, existen al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis antenas y/o ramas a las que se pueden unir las moléculas de carga útil por sitio de glicosilación. En estos ejemplos, n es aproximadamente 8, mayor que 8, de aproximadamente 8 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 12, de aproximadamente 10 a aproximadamente 14, mayor que 14, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 6. Estos ejemplos se pueden lograr mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la expresión de la glicoproteína en una línea celular adecuada capaz de producir dichas estructuras de N-glicano multiantenarario y/o ramificado en la glicoproteína. Tales líneas celulares adecuadas son, por ejemplo, líneas celulares CHO o HEK-293. En uno de tales ejemplos, la glicoproteína es un anticuerpo que comprende un sitio de glicosilación no Asn297 que puede comprender dichas estructuras de N-glicano multiantenararias y/o ramificadas. En una realización, la glicoproteína comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor de sialiltransferasa seleccionado del grupo que consiste en Gal β , Gal β 4GlcNAc, Gal β 3GlcNAc, Gal β 3GalNAc, GalNAc β , GalNAc α , GalNAc β 4GlcNAc y ácido siálico.

En un ejemplo, la glicoproteína comprende un N-glicano que comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más sitios aceptores de sialiltransferasa seleccionados del grupo que consiste en Gal β , Gal β 4GlcNAc, Gal β 3GlcNAc, Gal β 3GalNAc, GalNAc β , GalNAc α , GalNAc β 4GlcNAc y ácido siálico.

En una realización, la glicoproteína es una glicoproteína recombinante producida en una célula que es capaz de producir glicoproteínas en la que están enriquecidos los sitios aceptores de sialiltransferasa.

En una realización, la glicoproteína es una glicoproteína recombinante producida en una célula que es capaz de producir glicoproteínas en la que están enriquecidos los N-glicanos que comprenden residuos Gal β terminal y/o que no comprenden ácido siálico terminal.

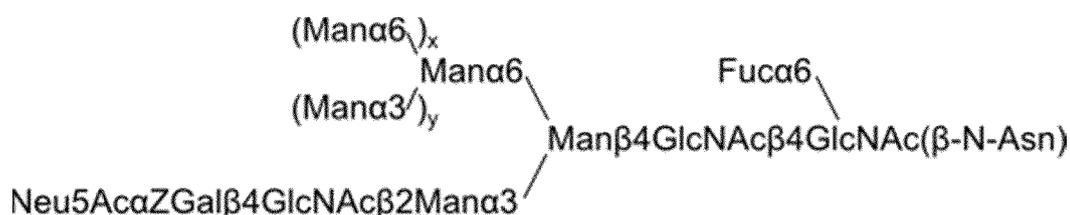
El N-glicano puede ser cualquier N-glicano, a condición de que el N-glicano comprenda un residuo de GlcNAc unido por una unión β -N a una asparagina.

En una realización, el N-glicano comprende un residuo de Gal β terminal. En una realización, el N-glicano comprende uno, dos o más residuos de Gal β terminales.

En un ejemplo, el N-glicano es un N-glicano tipo complejo biantenarario.

En un ejemplo, el N-glicano es un N-glicano tipo complejo monoantenarario.

En una realización, el N-glicano tiene una estructura de acuerdo con la fórmula



en la que

(β -N-Asn) = unión β -N a Asn;

Z = 3 o 6;

x = 0 o 1; y

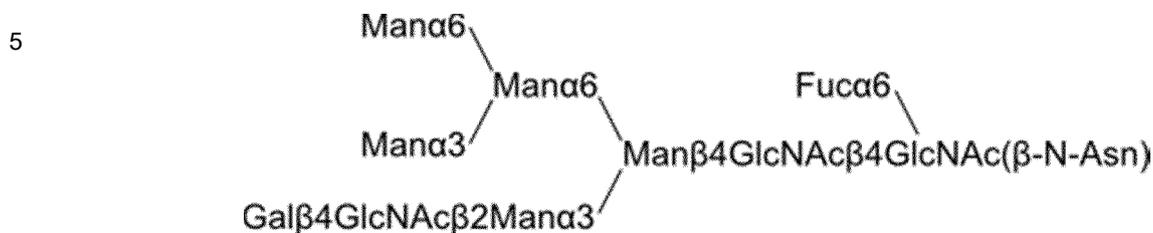
y = 0 o 1.

En una realización, x = 1 e y = 1.

En este contexto, los términos "Neu5Ac", "NeuNAc" y "ácido siálico" se refieren al ácido N-acetilneuramínico; todos los residuos de monosacáridos están en forma de piranosa; todos los monosacáridos son azúcares D excepto L-fucosa; "HexNAc" se refiere a un azúcar N-acetilhexosamina; y "dHex" se refiere a un azúcar desoxihexosa. En una realización de la presente invención, el "ácido siálico" también se puede referir a otros ácidos siálicos además del

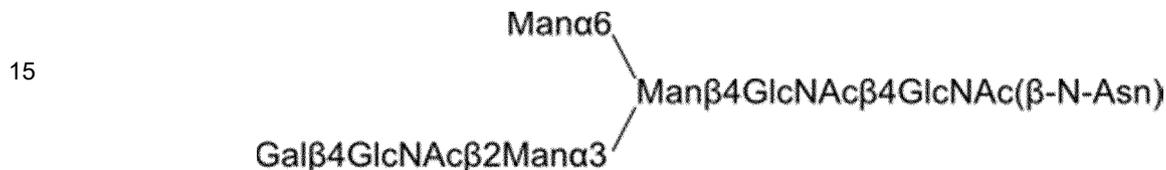
ácido N-acetilneuramínico, tal como el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc).

En una realización, el N-glicano tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



10 El N-glicano de acuerdo con las dos fórmulas previas y procedimientos para producirlos se divulgan en detalle en la publicación del documento WO 2013/087992. En particular, los procedimientos para producirlos se divulgan en la p. 32, línea 30 – p. 48, línea 2 y en los Ejemplos 1, 2, 5, 7 y 8 del documento WO 2013/087992.

En una realización, el N-glicano tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



en la que

(β-N-Asn) = unión β-N a Asn.

20 El N-glicano de acuerdo con esta fórmula y y procedimientos para producirlos se divulgan en detalle en la publicación del documento WO 2013/087993. En particular, los procedimientos para producirlos se divulgan en la p. 29, línea 31-p. 41, línea 21 y en los Ejemplos 1, 2, 5 y 8 del documento WO 2013/087993.

El N-glicano es a N-glicano tipo híbrido.

25 En un ejemplo, R es un enlace glicosídico al N-glicano o un enlace glicosídico al residuo de GlcNAc unido por una unión β-N a una asparagina;

X¹ es H o carboxilo;

X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L;

X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L;

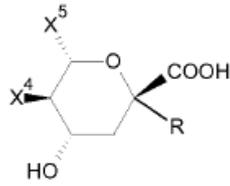
30 a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L; y

a condición de que cuando X¹ es carboxilo, entonces X² es H; X³ es OH; X⁴ es OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, o un enlace a L;

35 X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido; R es un enlace glicosídico al N-glicano; y X⁴ es un enlace a L o X⁵ se une por medio de un enlace a L; o

cuando X¹ es H, entonces R es un enlace glicosídico al residuo de GlcNAc unido por una unión β-N a una asparagina.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula III



Fórmula III

en la que

R es un enlace glicosídico al N-glicano;

5 X⁴ es OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido;

y X⁴ es un enlace a L o X⁵ se une por medio de un enlace a L.

En una realización, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula III,

en la que

R es un enlace glicosídico al N-glicano;

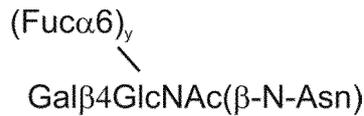
10 X⁴ es OH, H, amino, acilamida C₂-C₆ o éster de fosfato o sulfato; X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido;

y X⁵ se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, la glicoproteína comprende un sitio aceptor de sialiltransferasa y R es un enlace glicosídico al sitio aceptor de sialiltransferasa.

15 En un ejemplo, el N-glicano comprende un residuo de Galβ terminal y R es un enlace glicosídico al residuo de Galβ terminal.

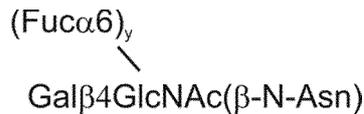
En un ejemplo, el N-glicano comprende una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula



20

en la que y es 0 o 1.

En un ejemplo, el N-glicano consiste en una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula



25

en la que y es 0 o 1.

En una realización, el N-glicano consiste en la estructura representada por la fórmula IV



Fórmula IV

en la que $(\beta\text{-N-Asn})$ es una unión $\beta\text{-N}$ a una asparagina e y es 0 o 1.

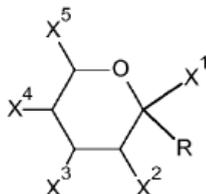
En una realización, n es 2-18. En una realización, n es 2-16. En una realización, n es 2-10. En otras realizaciones, n es 2-6; 2-5; 2-4; 2-3; 3-4; o 1, 2, 3 o 4. n , es decir, el número de moléculas de carga útil tóxicas conjugadas a una glicoproteína única, puede depender por ejemplo de la glicoproteína, del número de N-glicanos presentes en la glicoproteína, la estructura de los N-glicanos presentes en la glicoproteína, y el procedimiento de preparación del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína. Típicamente, un valor grande de n puede llevar a una mayor toxicidad del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína; por otra parte, un valor grande de n en algunos casos puede afectar adversamente las propiedades del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, tal como las propiedades farmacocinéticas.

En una realización, la glicoproteína comprende uno, dos, tres, cuatro o más N-glicanos que comprenden un residuo GlcNAc unido por una unión $\beta\text{-N}$ a una asparagina.

En una realización, la glicoproteína comprende uno, dos, tres, cuatro o más sitios aceptores de sialiltransferasa.

En una realización, la glicoproteína comprende uno, dos, tres, cuatro o más N-glicanos que comprende un residuo de Gal β terminal o un residuo de GlcNAc unido por una unión $\beta\text{-N}$ a una asparagina.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula II



Fórmula II

en la que R es un enlace glicosídico a la estructura representada por la fórmula IV



Fórmula IV

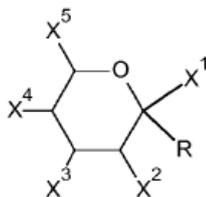
20 en la que $(\beta\text{-N-Asn})$ es una unión $\beta\text{-N}$ a una asparagina e y es 0 o 1;

X^1 es H;

X^2 , X^3 y X^4 son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida $C_2\text{-}C_6$, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; X^5 es CH_2OH , carboxilo, CH_3 , H, alquilo $C_1\text{-}C_3$ o alquilo $C_1\text{-}C_3$ sustituido, o un enlace a L;

25 a condición de que un sustituyente seleccionado de X^2 , X^3 , X^4 y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, el N-glicano comprende la estructura de sacárido G representado por la fórmula II



Fórmula II

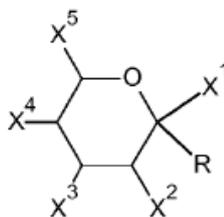
en la que R es un enlace glicosídico a la estructura representada por la fórmula IV



Fórmula IV

en la que (β-N-Asn) es una unión β-N a una asparagina e y es 0 o 1;

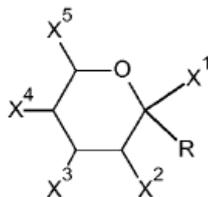
- 5 X¹ es H;
- X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L;
- a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.
- 10 En un ejemplo, la estructura anomérica de G se selecciona del grupo que consiste en la configuración β-D-galacto, β-D-gluco y α-L-fuco.
- En un ejemplo, la estructura anomérica de G está en la configuración β-D-galacto o β-D-gluco y R es un enlace glicosídico en la posición 4 del residuo de GlcNAc.
- En una realización, la estructura anomérica de G es la configuración β-D-galacto.
- 15 En una realización, R es un enlace glicosídico hidrolizable mediante una glicohidrolasa lisosómica.
- En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula IIb



Fórmula IIb

en la que X¹ es H o carboxilo;

- 20 X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L;
- a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L; y
- R es un enlace glicosídico al N-glicano hidrolizable mediante una glicohidrolasa lisosómica.
- En un ejemplo, el N-glicano comprende la estructura de sacárido G representado por la fórmula IIb



Fórmula IIb

en la que X^1 es H o carboxilo;

X^2 , X^3 y X^4 son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C_2-C_6 , éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; X^5 es CH_2OH , carboxilo, CH_3 , H, alquilo C_1-C_3 o alquilo C_1-C_3 sustituido, o un enlace a L;

- 5 a condición de que un sustituyente seleccionado de X^2 , X^3 , X^4 y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L; y

R es un enlace glicosídico al N-glicano hidrolizable mediante una glicohidrolasa lisosómica.

En una realización, R es un enlace glicosídico hidrolizable mediante una glicohidrolasa lisosómica.

- 10 En este contexto, el término "enlace glicosídico hidrolizable mediante una glicohidrolasa lisosómica" se debe entender que se refiere a un enlace glicosídico que una glicohidrolasa lisosómica es capaz de hidrolizar *in vitro* o *in vivo*.

En una realización, R es un enlace O-glicosídico.

En una realización, la glicohidrolasa lisosómica es una β -galactosidasa, β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa, α -galactosidasa, α -glucosidasa, α -manosidasa, β -manosidasa, α -fucosidasa o neuraminidasa lisosómica.

- 15 En una realización, la glicohidrolasa lisosómica es una β -galactosidasa lisosómica.

En una realización, la glicohidrolasa lisosómica es una β -hexosaminidasa lisosómica.

En una realización, la glicohidrolasa lisosómica es una neuraminidasa lisosómica.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula IIb, en la que X^1 es H y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

- 20 En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula IIb, en la que X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-galacto y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula IIb, en la que X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-glucó y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

- 25 En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula IIb, en la que X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-galacto, X^3 y X^4 son grupos OH, y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula IIb, en la que X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-galacto, X^2 y X^3 y X^4 son grupos OH, y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

- 30 En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula IIb, en la que X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-galacto o β -D-glucó, X^2 es un grupo acetamido, X^3 y X^4 son grupos OH, y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula III, en la que X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula III, en la que X^5 es $CH(OH)CH(OH)CH_2X^9$, en la que X^9 es un enlace a L.

- 35 En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula III, en la que X^4 es un grupo acilamido C_2 tales como grupo acetamido, y X^5 es $CH(OH)CH(OH)CH_2X^9$, en la que X^9 es un enlace a L.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula III, en la que X^4 es un grupo acilamido C_2 tales como grupo acetamido, y X^5 es $CH(OH)CH(OH)CH_2X^9$, en la que X^9 es un enlace a L.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula III, en la que X^4 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a

L.

En un ejemplo, G es de acuerdo con la Fórmula III, en la que X⁴ es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L, y X⁵ es CH(OH)CH(OH)CH₂OH.

5 En un ejemplo, la estructura anomérica del sustituyente X⁵ en las estructuras de acuerdo con Fórmula III es como en el ácido neuramínico y como se expone en el Ejemplo 3.

Una glicohidrolasa lisosómica puede liberar la molécula de carga útil tóxica en forma activa dentro de una célula. El conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano puede ser más potente y/o activo dentro de una célula que el conjugado de glicoproteína-molécula de carga útil tóxica.

10 En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X², X³, X⁴ y X⁵ se selecciona de acuerdo con los ensayos de estabilidad en suero o plasma en pH neutro y ensayos de hidrólisis en presencia de glicohidrolasas lisosómicas en pH ácido.

En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X², X³, X⁴ y X⁵ se selecciona de acuerdo con alta estabilidad en suero y plasma como se expone en el Ejemplo 15.

15 En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X², X³, X⁴ y X⁵ se selecciona de acuerdo con tasa alta de hidrólisis en presencia de glicohidrolasa lisosómicas en pH ácido como se expone en el Ejemplo 16.

En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X², X³, X⁴ y X⁵ se selecciona de acuerdo con alta estabilidad en suero y plasma como se expone en el Ejemplo 15 y de acuerdo con alta tasa de hidrólisis en presencia de glicohidrolasas lisosómicas en pH ácido como se expone en el Ejemplo 16.

Un conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano representado por la fórmula V también se divulga

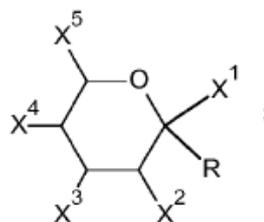
20 D-L-G Fórmula V

en la que

D es una molécula de carga útil tóxica;

L es un grupo ligador que une covalentemente G a D; y

G es una estructura de sacárido representada por la fórmula VI



Fórmula VI

25

en la que

R es OH, N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina;

X¹ es H o carboxilo;

30 X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L;

a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L; y

a condición de que cuando X¹ es carboxilo, entonces X² es H, X³ es OH, X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido; R es OH; y X⁴ es un enlace a L o X⁵ se une por medio de un enlace a L; o

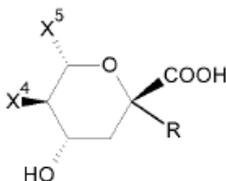
35 cuando X¹ es H, entonces R es N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina.

El conjugado molécula de carga útil tóxica-glicano se puede prepararse o formar, por ejemplo, mediante hidrólisis del glicoproteína-molécula de carga útil tóxica de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria

con una hidrolasa lisosómica *in vitro*, por ejemplo de acuerdo con el Ejemplo 15, mediante el contacto del conjugado con células que internalizan el conjugado, por ejemplo de acuerdo con Ejemplo 14, o *in vivo* mediante la administración del conjugado a un animal que comprende células capaces de internalizar el conjugado (tales como las células cancerosas).

- 5 En un ejemplo, R es N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina, y la N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina está libre. En otras palabras, la N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina no se une a una glicoproteína.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula VII



Fórmula VII

- 10 R es OH;
 X⁴ es OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L;
 X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido;
 y X⁴ es un enlace a L o X⁵ se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula VII en la que

- 15 R es OH;
 X⁴ es OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato; X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido;
 y X⁵ se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo,

R es N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina;

- 20 X¹ es H;
 X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L; y X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L;
 a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

- 25 En un ejemplo, R es N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina, y la estructura anomérica de G se selecciona del grupo que consiste en la configuración β-D-galacto, β-D-gluco y α-L-fuco.

En un ejemplo, R es N-acetilglucosaminilasparagina o 6-fucosil-N-acetilglucosaminilasparagina, y la estructura anomérica de G está en la configuración β-D-galacto.

En un ejemplo, R está representado por la fórmula



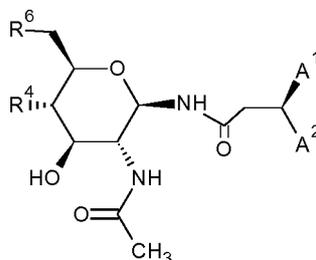
- 35 en la que R⁴ es OH o un enlace glicosídico a G;
 R⁶ es OH, α-L-fucosa o un enlace glicosídico a G;

A1 es amino y A2 es carboxilo;

a condición de que R^4 o R^6 es un enlace glicosídico a G.

En un ejemplo, R está representado por la fórmula

5



10

en la que R^4 es un enlace glicosídico a G;

R^6 es OH o α -L-fucosa;

A1 es amino y A2 es carboxilo;

15

y G es de acuerdo con la Fórmula II, en la que el anillo piranosa está en la configuración β -D-galacto o β -D-gluco;

X^1 es H;

X^2 es OH, grupo acetamido o un enlace a L; X^3 y X^4 son cada uno OH; y

X^5 es CH_2OH o un enlace a L;

20

a condición de que un sustituyente seleccionado de X^2 y X^5 es un enlace a L o se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo de la invención, uno o más de los sustituyentes X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se selecciona del grupo que consiste en H, OH, CH_2OH , COOH, COOR', alquilo C_1-C_8 , O(alquilo C_1-C_8), arilo, COR', OCOR', CONH₂, CONHR', CONR'₂, NHCOR', SH, SO₂R', SOR', OSO₂OH, OPO(OH)₂, halógeno, N₃, NH₂, NHR', NR'₂, o NHCO(alquilo C_1-C_8), en los que cada R' es de modo independiente H, alquilo C_1-C_8 o arilo.

25

En un ejemplo, uno o más de los sustituyentes X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se selecciona de todos los sustituyentes químicos descriptos en la presente memoria.

30

En un ejemplo, D es D', en el que D' es la molécula de carga útil tóxica que comprende un resto amino, a través del cual la molécula de carga útil tóxica se puede unir para formar una amina secundaria o terciaria. En las fórmulas VIII, IX, X y XI, D' en consecuencia se debe entender que se refiere a la misma molécula de carga útil tóxica como D mostrada en las fórmulas I, V y XIV a condición de que D es D'.

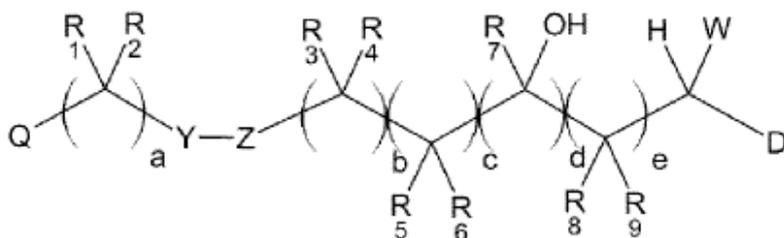
El grupo ligador puede ser un grupo ligador adecuado capaz de unir de modo covalente G a D. Los ligadores que se pueden utilizar, en principio, se describen por ejemplo en Dosio et al., Toxins 2011, 3, 848-883, y Sammet et al., Pharm. Pat. Analyst 2012, 1(1), 2046-8954.

En una realización, el grupo ligador es hidrófilo.

35

n una realización, el grupo ligador comprende al menos un grupo OH.

En una realización, L es un grupo ligador representado por la fórmula VIII



Fórmula VIII

en la que

5 Y es un oxígeno, azufre, amina, amida, péptido o ausente, en la que el péptido es una unidad E₁-P-E₂ en la que E₁ y E₂ son de modo independiente C=O, O o NR_p, en la que R_p es H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₈ sustituido, P es una unidad peptídica de 2 a 5 aminoácidos de longitud, y E₁ y E₂ se pueden unir de modo independiente al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido;

Z es un sacárido o ausente;

10 D' es la molécula de carga útil tóxica, en la que la molécula de carga útil tóxica comprende un resto amina, a través del cual se une la molécula de carga útil tóxica para formar una amina secundaria o terciaria;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son cada uno de modo independiente H, OH, amina, acilamida C₂-C₆, carboxilo, carboxilo sustituido, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido;

W es H, CH₂OH, CH₃, carboxilo, carboxilo sustituido, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido;

15 a es un número entero de 0 a 6;

b es 0 o 1;

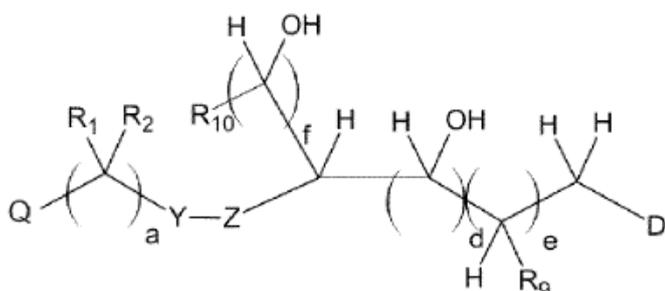
c y e son cada uno de modo independiente un número entero de 0 a 7;

d es un número entero de 1 a 7;

20 Q es E'-F'-E, en el que F' es una amina, amida, disulfuro, tioéter, tioéster, hidrazona, base de Schiff, oxima, producto de reacción de metátesis de olefina, grupo triazol o fosfina, u otro grupo generado por la reacción del grupo funcional F-E y el grupo funcional F', en el que F es un grupo funcional que puede reaccionar con una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina, y F' es una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina; y E está ausente o una unidad de unidad de polietileno de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en la que p es un número entero de 2 a aproximadamente 20; y E y E' son cada uno de modo independiente ausente o es una unidad de polietileno de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en la que p es un número entero de 2 a aproximadamente 20; y

25 Q se une por medio de un enlace a G.

En una realización, L es un grupo ligador representado por la fórmula IX



Fórmula IX

30

en la que

35 Y es un oxígeno, azufre, amina, amida, péptido o ausente, en la que el péptido es una unidad E₁-P-E₂ en la que E₁ y E₂ son de modo independiente C=O, O o NR_p, en la que R_p es H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, P es una unidad peptídica de 2 a 5 aminoácidos de longitud, y E₁ y E₂ se pueden unir de modo independiente al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido;

Z es un sacárido o ausente;

D' es la molécula de carga útil tóxica, en la que la molécula de carga útil tóxica comprende un resto amina, a través del cual se une la molécula de carga útil tóxica para formar una amina secundaria o terciaria;

5 R¹, R², R⁹ y R₁₀ son cada uno de modo independiente H, OH, amina, acilamida C₂-C₆, carboxilo, carboxilo sustituido, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido;

a es un número entero de 0 a 6;

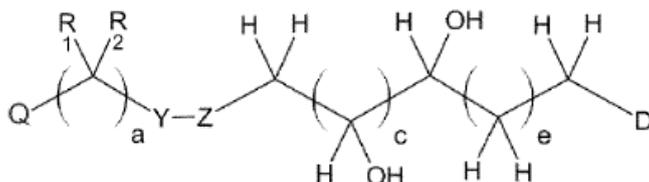
e es un número entero de 0 a 3;

d y f son números enteros de 0 a 4 a condición de que su suma es de 1 a 4;

10 Q es E'-F'-E, en el que F' es una amina, amida, amida, disulfuro, tioéter, tioéster, hidrazona, base de Schiff, oxima, producto de reacción de metátesis de olefina, grupo triazol o fosfina, u otro grupo generado por la reacción del grupo funcional F-E y el grupo funcional F', en el que F es un grupo funcional que puede reaccionar con una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina, y F' es una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina; y E está
15 ausente o una unidad de unidad de polietilenoxi de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en la que p es un número entero de 2 a aproximadamente 20; y E y E' son cada uno de modo independiente ausente o es una unidad de polietilenoxi de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en la que es un número entero de 2 a aproximadamente 20; y

Q se une por medio de un enlace a G.

En una realización, L es un grupo ligador representado por la fórmula X



Fórmula X

20

en la que

25 Y es un oxígeno, azufre, amina, amida, péptido o ausente, en la que el péptido es una unidad E₁-P-E₂ en la que E₁ y E₂ son de modo independiente C=O, O o NR_p, en la que R_p es H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido, P es una unidad peptídica de 2 a 5 aminoácidos de longitud, y E₁ y E₂ se pueden unir de modo independiente al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido;

Z es un sacárido o ausente;

D' es la molécula de carga útil tóxica, en la que la molécula de carga útil tóxica comprende un resto amina, a través del cual se une la molécula de carga útil tóxica para formar una amina secundaria o terciaria;

30 R¹ y R² son cada uno de modo independiente H, OH, amina, acilamida C₂-C₆, carboxilo, carboxilo sustituido, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ sustituido;

a es un número entero de 0 a 6;

c y e son cada uno de modo independiente un número entero de 0 a 3;

35 Q es E'-F'-E, en el que F' es amina, amida, amida, disulfuro, tioéter, tioéster, hidrazona, base de Schiff, oxima, producto de reacción de metátesis de olefina, grupo triazol o fosfina, u otro grupo generado por la reacción del grupo funcional F-E y el grupo funcional F', en el que F es un grupo funcional que puede reaccionar con una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina, y F' es una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina; y E está
40 ausente o es una unidad de polietilenoxi de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en la que p es un número entero de 2 a aproximadamente 20; y

Q se une por medio de un enlace a G.

En un ejemplo, F es un grupo reactivo amina, un grupo reactivo tiol, un grupo reactivo azida, un grupo reactivo alquino, un grupo reactivo carbonilo en un grupo reactivo hidroxilamina.

5 En un ejemplo, F es un grupo reactivo amina, tales como (pero sin limitación) a un N-hidroxisuccinimida éster, p-nitrofenil éster, dinitrofenil éster, o pentafluorofenil éster.

En un ejemplo, F es un grupo reactivo tiol, tal como (pero sin limitación) piridildisulfuro, nitropiridildisulfuro, maleimida, haloacetato o cloruro de ácido carboxílico.

En un ejemplo, F es un grupo reactivo azida, tal como (pero sin limitación) alquino.

En un ejemplo, F es un alquino.

10 En un ejemplo, F es $\text{CH}=\text{C}$.

En un ejemplo, F es un grupo dibenzociclooctilo (DBCO).

En una realización de la invención, F es un grupo reactivo alquino, (tal como sin limitación) azida.

En una realización, F es azida.

En un ejemplo, F es un grupo reactivo carbonilo, tal como (pero sin limitación) hidroxilamina.

15 En un ejemplo, F es un grupo reactivo hidroxilamina, tal como (pero sin limitación) aldehído o cetona.

En un ejemplo, F es isotiocianato, isocianato, cloruro de sulfonilo, glioxal, epóxido, oxirano, carbonato, haluro de arilo, imidoéster, carbodiimida, o anhídrido.

En una realización, Z está ausente.

En una realización, Z es un sacárido.

20 En una realización, Z es un oligosacárido con un grado de polimerización de 1 a aproximadamente 20; de 1 a 10; de 1 a 8; de 1 a 6; de 1 a 5; de 1 a 4; de 1 a 3; de 1 a 2; o 1, 2, 3, 4 o 5.

En una realización, Z es un monosacárido, disacárido o trisacárido.

En una realización, Z es OH.

En una realización, Z es H.

25 En una realización, a es 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

En una realización, a es 1.

En una realización, b es 0.

En una realización, b es 1.

En una realización, c es 0.

30 En una realización, c es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En una realización, d es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En una realización, d es 3, 4 o 5.

En una realización, d es 3.

En una realización, d es 4.

35 En una realización, d es 5.

En una realización, d es 6.

En una realización, e es 0.

En una realización, e es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En una realización, d es 3; y R^7 es H.

- En una realización, d es 4; y R^7 es H.
- En una realización, b es 1; y R^3 y R^4 son cada uno H.
- En una realización, a es 1; y R^1 y R^2 son cada uno H.
- En una realización, e es 1; y R^8 y R^9 son cada uno H.
- 5 En una realización, a, b, c, o e es 0.
- En una realización, a, b, c, y/o e es 0.
- En una realización, W es H.
- En una realización, a es 2 o 3; y R^1 y R^2 son cada uno H.
- En una realización, Y es oxígeno.
- 10 En una realización, Y es azufre.
- En una realización, Y es un péptido.
- En una realización, Y es un péptido que comprende una unidad E_1 -P- E_2 en la que E_1 y E_2 son de modo independiente C=O, O o NR_p , en la que R_p es H, alquilo C_1 - C_6 o alquilo C_1 - C_6 sustituido, P es una unidad peptídica de 2 a 5 aminoácidos de longitud, y E_1 y E_2 se pueden unir de modo independiente al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido.
- 15 En una realización, Y es un péptido que es una unidad E_1 -P- E_2 en la que E_1 y E_2 son de modo independiente C=O, O o NR_p , en la que R_p es H, alquilo C_1 - C_6 o alquilo C_1 - C_6 sustituido, P es una unidad peptídica de 2 a 5 aminoácidos de longitud, y E_1 y E_2 se pueden unir de modo independiente al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido.
- 20 En una realización, Y es un péptido de 2 a 5 aminoácidos de longitud.
- En una realización, el péptido está unido al grupo ligador a través del nitrógeno terminal es decir, a través del extremo amino terminal por un enlace amida.
- En una realización, el péptido está unido al grupo ligador a través del carbono terminal es decir, a través del extremo terminal carboxi mediante un enlace amida o un enlace éster.
- 25 En una realización, el péptido está unido al grupo ligador a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido mediante un enlace amida, éster, disulfuro o tioéter.
- En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos escindible por una peptidasa lisosómica, por ejemplo L-Gly-L-Gly, L-Val-L-Cit, L-Phe-L-Leu, L-Leu-L-Ala-L-Leu, L-Leu-L-Ala-L-Ala, L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu, y similares.
- 30 En una realización, Q es $E'-F'-E$, en el que F' es un grupo triazol generado por la reacción del grupo funcional F-E y el grupo funcional F' , en la que F es una azida y F' es un alquino; y E está ausente.
- En una realización, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^7 son cada uno H; W es H; a es 1; b es 1; c y e son cada uno 0; y d es 4.
- En una realización, R^3 , R^4 , y R^7 son cada uno H; W es H; b es 1; a, c y e son cada uno 0; y d es 4.
- 35 En una realización, L es un grupo ligador representado por la fórmula X, en la que Y es un oxígeno o ausente; Z es ausente;
- D' es la molécula de carga útil tóxica, en la que la molécula de carga útil tóxica comprende un resto amina, a través del cual se une la molécula de carga útil tóxica para formar una amina secundaria o terciaria;
- R^1 y R^2 son cada uno de modo independiente H o OH; a es 1 o 2;
- 40 c es 0, 1, 2 o 3;
- e es 0 o 1;
- Q es $E'-F'-E$, en el que F' es un grupo triazol generado por la reacción del grupo funcional F-E y el grupo funcional F' , en el que F es una azida y F' es un alquino; E está ausente; y
- Q se une por medio de un enlace a G.

El término "alquilo" se debe entender que se refiere a un hidrocarburo saturado o insaturado de cadena lineal o ramificada que tiene el número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, "alquilo C₁-C₈" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono). Cuando no se indica el número de átomos de carbono, el grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos representativos "alquilo C₁-C₈" incluyen (pero sin limitación)

5 metilo (Me, CH₃), etilo (Et, CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, isopropilo, CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, isobutilo, CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, terc-butilo, C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentilo (CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentilo (CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentilo (C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentil (CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentilo (CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), y 3, 3-dimetil-2-butilo (CH(CH₃)C(CH₃)₃). Un grupo alquilo puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, OH, O(alquilo C₁-C₈), arilo, COR', OCOR', CONH₂, CONHR', CONR'₂, NHCOR', SH, SO₂R', SOR', OSO₂OH, OPO(OH)₂, halógeno, N₃, NH₂, NHR', NR'₂, NHCO(alquilo C₁-C₈) o CN, en los ue cada R' es de modo independiente H, alquilo C₁-C₈ o arilo. El término "alquilo" también se debe entender que se refiere a un alquilenilo, un radical hidrocarbonado cíclico, saturado, ramificado o lineal de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano original. Estos alquilenos típicos incluyen (pero sin limitación) metileno (CH₂), 1,2-etilo (CH₂CH₂), 1,3-propilo (CH₂CH₂CH₂), 1,4-butilo (CH₂CH₂CH₂CH₂), y similares. El término "alquilo" también debe entenderse que se refiere a los radicales arilalquilo y heteroarilalquilo como se describe a continuación.

El término "alquilenilo" se debe entender que se refiere a un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono, sp². Los ejemplos incluyen, pero sin limitación etileno o vinilo (CH=CH₂), alilo (CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (C₅H₇), y 5-hexenilo (CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂). El término "alquilenilo" también se debe entender que se refiere a un alquenileno, un radical hidrocarburo insaturado de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno original. Los radicales alquenileno típicos incluyen, pero sin limitación 1,2-etileno (CH=CH).

El término "alquinilo" se debe entender que se refiere a un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono, sp². Los ejemplos incluyen, pero sin limitación acetilénico (C≡CH) y propargilo (CH₂C≡CH). El término "alquinilo" también se debe entender que se refiere a un alquinileno, un radical hidrocarburo insaturado de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alquino original. Los radicales alquinileno típicos incluyen, pero sin limitación acetileno (C≡C), propargilo (CH₂C≡CH), y 4-pentinilo (CH₂CH₂CH₂C≡C).

El término "arilo" se debe entender que se refiere a un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono único de un sistema de anillo aromático original. Un grupo arilo puede estar no sustituido o sustituido. Los grupos arilo típicos incluyen (pero sin limitación) radicales derivados de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. Un arilo puede estar sustituido con uno o más grupos que incluye, pero sin limitación, OH, O(alquilo C₁-C₈), arilo, COR', OCOR', CONH₂, CONHR', CONR'₂, NHCOR', SH, SO₂R', SOR', OSO₂OH, OPO(OH)₂, halógeno, N₃, NH₂, NHR', NR'₂, NHCO(alquilo C₁-C₈) o CN, en el que cada R' es de modo independiente H, alquilo C₁-C₈ o arilo. El término "arilo" también se debe entender que se refiere a un grupo arileno que es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones para, meta u orto, en las que el grupo fenilo puede estar no sustituido o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen pero sin limitación OH, O(alquilo C₁-C₈), arilo, COR', OCOR', CONH₂, CONHR', CONR'₂, NHCOR', SH, SO₂R', SOR', OSO₂OH, OPO(OH)₂, halógeno, N₃, NH₂, NHR', NR'₂, NHCO(alquilo C₁-C₈) o CN, en el que cada R' es de modo independiente H, alquilo C₁-C₈ o arilo.

El término "arilalquilo" se debe entender que se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza con un radical arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen (pero sin limitación) bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo, y similares. El grupo arilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluidos los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono.

El término "heteroarilalquilo" se debe entender que se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza con un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo típicos incluyen (pero sin limitación) 2-bencimidazolilmetilo, 2-furiletilo y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, que incluyen los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo tiene de 5 a 14 átomos anulares, típicamente de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y

S, el resto son átomos de carbono. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros anulares (2 a 6 átomos de carbono) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros anulares (4 a 9 átomos de carbono) y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S, por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

- 5 Los términos "alquilo sustituido", "arilo sustituido" y "arilalquilo sustituido" se debe entender que se refiere a alquilo, arilo, y arilalquilo, respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan cada uno de modo independiente con un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen pero sin limitación X, R, -O-, OR, SR, -S-, NR², NR³, =NR, CX³, CN, OCN, SCN, N=C=O, NCS, NO, NO₂, =N₂, N₃, NRCOR, COR, CONR², -SO₃-, SO₃H, SO₂R, OSO₂OR, SO₂NR, SOR, OPO(OR)₂, PO(OR)₂, -PO₃-, PO₃H₂, COR, COX, C(=S)R, CO₂R, -CO₂-, C(=S)OR, COSR, C(=S)SR, CONR², C(=S)NR², y C(=NR)NR², donde cada X es de modo independiente un halógeno: F, Cl, Br, o I; y cada R es de modo independiente H, alquilo C₂-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, heterociclo C₃-C₁₄ o grupo protector. Los grupos alquilenos, alquenileno, y alquinileno descritos anteriormente también se puede sustituir de modo similar.

- 15 Los términos "heteroarilo" y "heterociclo" se debe entender que se refiere a un sistema anular en que dos o más átomos anulares es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. El radical heterociclo comprende 1 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros anulares (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros anulares (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados del N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 hasta el presente), en particular Volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960).

- 25 Los ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y no limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahydro-piridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahydrofuranilo, bis-tetrahydrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, 30 indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolínulo, e isatinoílo.

- 35 A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos por carbono se unen en las siguientes posiciones: posición 2, 3, 4, 5, o 6 de una piridina; posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5, o 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5, o 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahydrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; posición 2, 4, o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4, o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol; posición 2 o 3 de un aziridina; posición 2, 3, o 4 de una azetidina; posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una quinolina; o 40 posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una isoquinolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos por carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolil y 5-tiazolilo.

- 45 A modo de ejemplo y no limitación, heterociclos unidos por nitrógeno se unen en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, o 1H-indazol; posición 2 de un esindol o isoindolina; posición 4 de una morfolina; y posición 9 de un carbazol o β-carbolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos por nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolil y 1-piperidinilo.

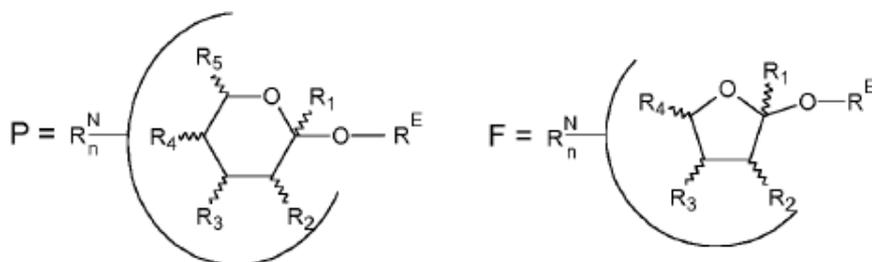
- 50 El término "carbociclo" se debe entender que se refiere a un anillo saturado o insaturado que tiene 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos 3 a 6 átomos anulares, aún más típicamente 5 o 6 átomos anulares. Los carbociclos bicíclicos tienen 7 a 12 átomos anulares, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos anulares dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

- 55 El término "sacárido" se debe entender que se refiere a restos de azúcar simples únicos o monosacáridos o sus derivados, así como combinaciones de dos o más restos de azúcar únicos o monosacáridos unidos covalentemente para formar disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Un sacárido puede ser un compuesto que incluye una o más unidades de monómero de cadena abierta o ciclada basado en una forma de cadena abierta de compuestos que 60 tienen la estructura química H(CHOH)_nC(=O)(CHOH)_mH, en la que la suma de n+m es un número entero en el

intervalo de 2 a 8. Por lo tanto, las unidades de monómero pueden incluir triosas, tetrasas, pentosas, hexosas, heptosas, octosas, nonosas y mezclas de las mismas. Uno o varios de los grupos hidroxilo en la estructura química se pueden reemplazar con otros grupos tales como hidrógeno, amino, amina, acilamido, acetilamido, halógeno, mercapto, acilo, acetilo, éster de fosfato o sulfato, y similares; y los sacáridos también pueden comprender otros grupos funcionales tales como grupos carboxilo, carbonilo, hemiacetal, acetal y tio. Los sacáridos pueden incluir monosacáridos que incluyen, pero sin limitación, aldosas simples tales como gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa y manohéptulosa; cetosas simples tales como dihidroxiacetona, eritrola, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa y pseudoheptulosa; desoxi azúcares tales como fucosa, 2-desoxiglucosa, 2-desoxirribosa y ramnosa; ácidos siálicos tales como ácido cetodesoxinonulosónico, ácido N-acetilneuramínico y ácido 9-O-acetil-N-acetilneuramínico; ácidos urónicos tales como ácido glucurónico, ácido galacturónico y ácido idurónico; azúcares amino tales como 2-amino-2-desoxigalactosa y 2-amino-2-desoxiglucosa; azúcares de acilamino tales como 2-acetamido-2-desoxigalactosa, 2-acetamido-2-desoxiglucosa y ácido N-glicolilneuramínico; azúcares fosforilados y sulfatados tales como 6-fosfomanosa, 6-sulfo-N-acetilglucosamina y 3-sulfogalactosa; y derivados y modificaciones de los mismos. El término "sacárido" también incluye carbohidratos no reductores tales como inositoles y alditos y sus derivados. Los sacáridos de acuerdo con la presente invención pueden estar en configuración D o L; en forma de cadena abierta, piranosa o furanosa; anómero α o β ; y cualquier combinación de los mismos.

El término "oligosacárido" se debe entender que se refiere a sacáridos compuestos por dos o varios monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos que tienen un grado de polimerización en el intervalo de 2 a aproximadamente 20. El término "oligosacárido" se debe entender como hetero y homopolímeros de referencia que pueden ser ramificados o lineales y tener un extremo reductor y un extremo no reductor, ya sea que el sacárido en el extremo reductor sea en efecto un azúcar reductor. Un oligosacárido descrito en la presente memoria se puede describir con el nombre o la abreviatura del sacárido no reductor, seguido de la configuración del enlace glicosídico (α o β), el enlace del anillo, la posición del anillo del sacárido reductor involucrado en el enlace, y posteriormente el nombre o la abreviatura del sacárido reductor, y así sucesivamente (por ejemplo, Gal β 1-4Glc para lactosa y Gal α 1-4Gal β 1-4Glc para globotriosa).

En una realización, los monosacáridos están en formas cicladas de piranosa (P) o furanosa (F) de acuerdo con las fórmulas:



en la que los grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son cada uno de modo independiente H, OH, CH_2OH , COOH, COOR', alquilo C_1-C_8 , O(alquilo C_1-C_8), arilo, COR', OCOR', $CONH_2$, CONHR', CONR', NHCOR', SH, SO_2R' , SOR' , OSO_2OH , $OPO(OH)_2$, halógeno, N_3 , NH_2 , NHR', NR', $NHCO$ (alquilo C_1-C_8) o RN, en la que cada R' es de modo independiente H, alquilo C_1-C_8 o arilo y cada RN es un sacárido de extremo no reductor; RE es H o estructura del extremo reductor tales como un sacárido; n es un número entero en el intervalo 0 a 3 en F o en el intervalo 0 a 4 en P; y la estereoquímica de cada R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 es dependiente de la estructura de monosacárido y su configuración y anomeridad.

El término "disacárido" se debe entender que se refiere a un sacárido compuesto de dos monosacáridos unidos entre sí por un enlace glicosídico. Los ejemplos de disacáridos incluyen, pero sin limitación, lactosa, N-acetilactosamina, galactobiosa, maltosa, isomaltosa y celobiosa.

El término "trisacárido" se debe entender que se refiere a un sacárido compuesto de tres monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos. Los ejemplos de trisacáridos incluyen, pero sin limitación, maltotriosa, sialillactosa, globotriosa, lacto-N-triosa y gangliotriosa.

El término "molécula de carga útil tóxica" se debe entender que se refiere a cualquier molécula tóxica adecuada para la conjugación de acuerdo con una o más realizaciones de la invención.

En una realización, a molécula de carga útil tóxica naturalmente comprende un resto amina primaria o secundaria. En una realización, una molécula de carga útil tóxica se modifica para comprender un resto amina primaria o secundaria. En una realización, la molécula de carga útil tóxica modificada con amina esencialmente retiene la actividad de la molécula de carga útil tóxica original.

La molécula de carga útil tóxica puede ser cualquier compuesto que provoca la muerte de una célula, o induce la muerte celular, o de alguna manera disminuya la viabilidad celular. La molécula de carga útil tóxica puede ser cualquiera de muchos fármacos de molécula pequeña, que incluyen, pero sin limitaciones, dolastatinas; auristatinas; epotilones; daunorrubicinas y doxorrubicinas; agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacina); camptotecinas (que incluyen el análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictiínas; espongiestatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, cloromafazina, clofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, calicheamicinas, especialmente calicheamicina γ 1; dinemicina, que incluyen dinemicina A; esperamicina; así como el cromóforo de neocarzinostatina y los cromóforos del antibiótico enediína cromoproteína relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina; cromomicinas, dactinomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, otros derivados de doxorrubicina que incluyen morfolinodoxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidodoxorrubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, nitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, pepomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, 5-fluorouracilo; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; maytansinoides, tales como maytansina, ansamitocinas, DM-1, DM-4; mitogazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanium; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (" Ara-C "); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; CPT-11; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores, tales como los antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, inhibidores de la aromatasas 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y torremifeno. (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; ARNSi; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, así como análogos y derivados de los mismos, algunos de los cuales se describen a continuación.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es una dolastatina, auristatina, doxorrubicina, DM1, epirubicina, duocarmicina, o cualquiera de sus análogos o derivados.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es una dolastatina, auristatina, doxorrubicina, o cualquiera de sus análogos o derivados.

50 En una realización, la molécula de carga útil tóxica es dolastatina 10 o cualquiera de sus derivados.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es dolastatina 15 o cualquiera de sus derivados.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es auristatina F o cualquiera de sus derivados.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es dolastatina 10, dolastatina 15, o auristatina F.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es dolastatina 10.

55 En una realización, la molécula de carga útil tóxica es dolastatina 15.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es auristatina F.

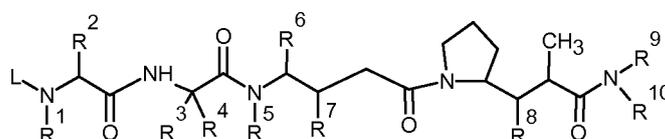
Las dolastatinas que se pueden usar en la presente invención son bien conocidas en la técnica y se pueden aislar de fuentes naturales de acuerdo con procedimientos conocidos o preparar sintéticamente de acuerdo con

procedimientos conocidos.

Los ejemplos de dolastatinas adecuadas incluyen monometil y desmetil dolastatinas 10, 15, C, D y H, monometil y desmetil isodolastatina H, y análogos y derivados de los mismos. Estas dolastatinas contienen una amina primaria o secundaria en el extremo N-terminal. Las dolastatinas 10 y 15 son las moléculas de carga útil tóxicas más potentes entre las dolastatinas naturales. Las monometil y desmetil dolastatinas 10 y 15 se pueden preparar mediante síntesis química de acuerdo con la química estándar de síntesis de péptidos.

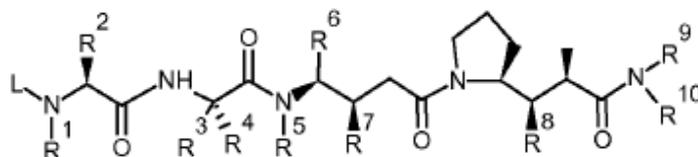
Las auristatinas que se pueden usar en la presente invención incluyen (pero sin limitación) monometil y desmetil auristatinas E, F, EB, EFP, PY, PYE, PE, PHE, TP, 2-AQ y 6-AQ, por ejemplo, descrito en la patente U.S. Núm. 5.635.483; Int. J. Oncol. 15: 367-72 (1999); Mol. Cancer Ther. 3: 921-32 (2004); Solicitud U.S Núm. 11/134.826; Publicaciones de Patentes U.S: Nros. 20060074008 y 2006022925; y Pettit, G.R., et al. (2011) J. Nat. Pinchar. 74: 962-8.

En una realización, los derivados de monometil y desmetil auristatina y dolastatina 10 están representados por la fórmula:



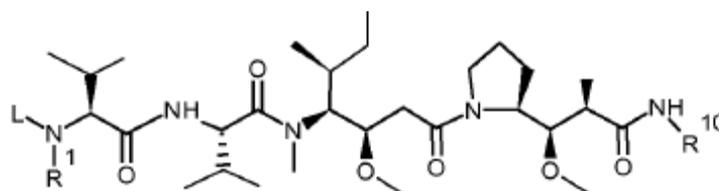
en la que L es H, o se puede entender que se refiere al grupo ligador; R¹, R⁵ y R⁹ son cada uno de modo independiente H o alquilo C₁-C₈; R², R³ y R⁶ son cada uno de modo independiente H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ o alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈); R⁴ es H o CH₃; o R³ y R⁴ forman en conjunto un anillo carbocíclico con el carbono al cual se unen y tienen la fórmula-(CR_aR_b)_n, en la que R_a y R_b se seleccionan de modo independiente de H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈; y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6; R⁷ y R⁸ se seleccionan cada uno de modo independiente de H, OH, alquilo C₁-C₈, C₃-C₈ carbociclo y O (alquilo C₁-C₈); R¹⁰ es CX₂-CX₂-arilo, CX₂-CX₂-(arilo sustituido), CX₂-CX₂-(heterociclo C₃-C₈), CX₂-(C₃-C₁₀ heterociclo), CX₂-CX₂-(carbociclo C₃-C₈), C(=O)O(alquilo C₁-C₄) o CH(CH₂R₁₂)C(=O)ZR₁₁; cada presentación de X es de modo independiente H, OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, heterociclo C₃-C₈, 2-tiazol o O(alquilo C₁-C₈); Z es O, S, NH o N(alquilo C₁-C₈); R₁₁ es H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, R¹³O)m-R₁₄ o R¹³O)m-CH(R¹⁵)₂; R₁₂ es arilo o heterociclo C₃-C₈; m es un número entero que varía de 1-1000; R¹³ es alquilo C₂-C₈; R₁₄ es H o alquilo C₁-C₈; cada presentación de R¹⁵ es de modo independiente H, COOH, (CH₂)_n-N(R₁₆)₂, (CH₂)_n-SO₃H o (CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₈; cada presentación de R₁₆ es de modo independiente H, alquilo C₁-C₈ o (CH₂)_n-COOH; y n es un número entero en el intervalo de 0 a 6.

En una realización, los derivados de monometil y desmetil auristatinas y dolastatina 10 están representados por la fórmula:



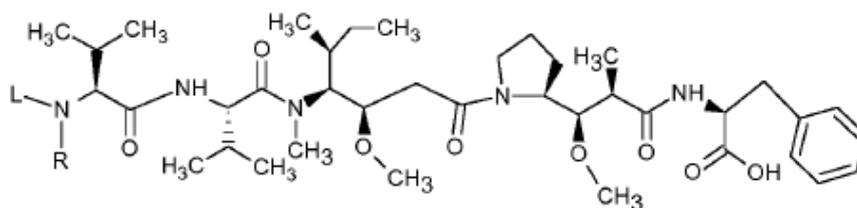
en la que los sustituyentes son como se describieron anteriormente.

En una realización, los los derivados de monometil y desmetil auristatinas y dolastatina 10 están representadas por la fórmula:



en la que los sustituyentes son como se describieron anteriormente.

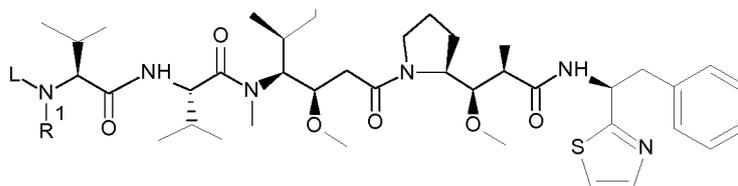
En una realización, los derivados de monometil y desmetil auristatina F están representados por la fórmula:



en la que L es H, o se puede entender que se refiere al grupo ligador; y R es H o CH₃.

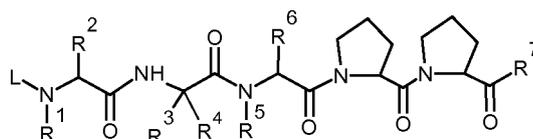
En una realización, los derivados de monometil y desmetil dolastatina 10 están representados por la fórmula:

5



en la que L es H, o se puede entender que se refiere al grupo ligador; y R¹ es H o CH₃.

10 En una realización, los análogos y derivados de monometil y desmetil dolastatina 15 están representados por la fórmula:



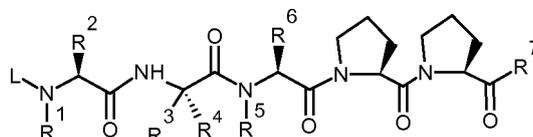
15

en la que L, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son como se describieron anteriormente; R⁷ es OH, NH₂, NHR⁸ o NR⁸R⁹; R⁸ y R⁹ son cada una de modo independiente H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilo C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈, alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈), benzil o terc-butilo; o R⁸ y R⁹ forman en conjunto un anillo heterocíclico con el nitrógeno al que están unidos y tienen la fórmula-(CR_aR_b)_n-, en la que R_a y R_b se seleccionan de modo independiente de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilo C₁-C₈-arilo, alquilo C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈, alquilo C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈), O(alquilo C₁-C₈), un doble enlace con un átomo de carbono vecino, o forman en conjunto un grupo carbonilo; y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6.

20

En una realización, los análogos y derivados de monometil y desmetil dolastatina 15 están representados por la fórmula:

25



en la que los sustituyentes son como se describieron anteriormente.

30 En una realización, el análogo o derivados de monometil y desmetil dolastatina 15 se selecciona del grupo de monometil y desmetil dolastatina 15, monometil y desmetil cemadotina, monometil y desmetil tasidotina, y monometil y desmetil P5 (los correspondientes compuestos dimetilo se describe en Bai et al. 2009. Mol. Pharmacol. 75:218-26).

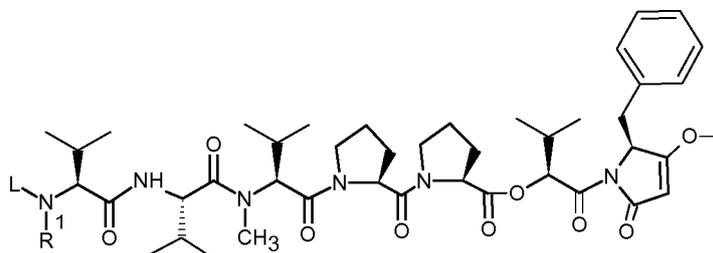
n una realización, los análogos y derivados de monometil y desmetil dolastatina 15 están representadas por la fórmula:

35

en la que Los sustituyentes son como se describieron anteriormente.

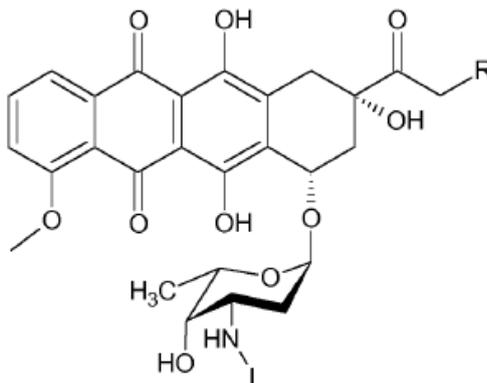
En una realización, los derivados de monometil y desmetil dolastatina 15 están representados por la fórmula:

5



en la que L es H, o se puede entender que se refiere al grupo ligador; y R¹ es H o CH₃.

- 10 La molécula de carga útil tóxica de acuerdo con la presente invención también puede ser daunorrubicina o doxorubicina. Se puede usar el grupo amino primario del resto de daunosamina o daunorrubicina o doxorubicina de la presente invención se puede modificar para comprender otro resto amina primaria o secundaria. Las moléculas de carga útil de doxorubicina y daunorrubicina preferidas útiles en la presente invención están de acuerdo con la fórmula:



15

en la que R es H o OH; y L es H, o se puede entender que se refiere al grupo ligador.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es un maytansinoide.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es maytansina, una ansamitocina, DM1 o DM4 (también conocido DM-4).

- 20 En una realización, la molécula de carga útil tóxica es DM1. DM1 también se conoce como DM-1 y mertansina.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es una rubicina. Las rubicinas adecuadas puede ser por ejemplo daunorrubicinas, doxorubicina, detorrubicina, otros derivados de doxorubicina que incluyen morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina, deoxidoxorrubicina, epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, rodorrubicina, zorrubicina, y pirarubicina.

- 25 En una realización, la molécula de carga útil tóxica es epirrubicinas.

En una realización, la molécula de carga útil tóxica es duocarmicina. Las duocarmixinas adecuadas pueden ser por ejemplo duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C₂, duocarmicina D, duocarmicina SA, duocarmicina MA, y CC-1065. El término "duocarmicina" se entender que se refiere también a los análogos sintéticos de las duocarmicinas, tales como adozelesina, bizelesina, carzelesina, KW-2189 y CBI-TMI.

- 30 En una realización, la duocarmicina es una duocarmicina adecuada para conjugar con el grupo ligador L. En una realización, la duocarmicina comprende un grupo amino u otro grupo químico adecuado para conjugar la duocarmicina con el grupo En una realización, la duocarmicina es una duocarmicina adecuada para conjugar con el grupo ligador L. En una realización, la duocarmicina comprende un grupo amino u otro grupo químico adecuado para conjugar la duocarmicina con el grupo ligador L. En una realización, el grupo amino es un grupo amino libre

- 35 Un experto en la técnica de moléculas de carga útil tóxicas comprenderá fácilmente que cada una de las moléculas de carga útil tóxicas descritas en el presente documento puede modificarse de tal manera que el compuesto

5 resultante aún conserva la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. La persona experta también comprenderá que muchos de estos compuestos se pueden usar en lugar de las moléculas de carga útil tóxicas descritas aquí. Por lo tanto, las moléculas de carga útil tóxicas de la presente invención deben entenderse como incluyendo cualquier análogos y derivados de los compuestos descritos en el presente documento. L. En una realización, el grupo amino es un grupo amino libre

10 Un experto en la técnica de moléculas de carga útil tóxicas comprenderá fácilmente que cada una de las moléculas de carga útil tóxicas descritas en la presente memoria se puede modificar de tal manera que el compuesto resultante aún conserva la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. La persona experta también comprenderá que muchos de estos compuestos se pueden usar en lugar de las moléculas de carga útil tóxicas descritas en la presente memoria. Por lo tanto, se debe entender que las moléculas de carga útil tóxicas de la presente invención incluyen cualquier análogos y derivados de los compuestos descritos en la presente memoria.

15 En un ejemplo, el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína se selecciona del grupo que consiste en conjugado de monometildolastatina-ácido aminooxiacético-cetuximab, conjugado de monometilauristatina-ácido aminooxiacético-cetuximab, conjugado de monometildolastatina-ácido aminooxiacético-levulinil-cetuximabe, conjugado de N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico oximecetuximab, conjugado de N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico oxima-cetuximab tratada con Endo S, conjugado de triazol de 9-azido-NeuAc-cetuximab y N-(6-O-propargil-D-galactosil)-mono-metilolastatina, conjugado de ABAA-MODO-7-
20 aldehído-NeuNAc-trastuzumab, conjugado de ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-anti-CD33, conjugado de ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-afucosil trastuzumab, conjugado de MO-DO-TREA-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab, conjugado de MODO-TRSLac-Lys-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab, conjugado de DM1-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-cetuximab, conjugado de MODO-Val-Cit-PAB-DBCO-9-azido-NeuAc-cetuximab, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-epirrubicinas y 9-azido-NeuAc-cetuximab, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-doxorubicina y conjugado de 9-azido-NeuAc-cetuximab, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)duocarmicina, MA y 9-azido-NeuAc-cetuximab, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)duocarmicina, y 9-azido-NeuAc-cetuximab, ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-cetuximab y ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-GMC012. El conjugado de monometildolastatina-ácido aminooxiacético-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado de MODO-AOAA-cetuximab, es decir, el conjugado mostrado en el Esquema 12.

30 El conjugado de monometilauristatina-ácido aminooxiacético-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado de MMAF-AOAA-cetuximab, es decir, el conjugado que tiene la misma estructura como el conjugado mostrado en el Esquema 12 excepto en que la monometildolastatina se ha reemplazado con monometilauristatina.

35 El conjugado de monometildolastatin-ácido aminooxiacético-levulinil-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 12 excepto en el que cetuximab se ha conjugado con ácido levulínico. La conjugación de ácido levulínico con cetuximab se puede realizar por la amidación del ácido levulínico en los grupos amino libres en cetuximab, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 24.

El conjugado de N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico oximecetuximab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 15.

40 El conjugado de N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico oxima-cetuximab tratada con Endo S se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 15, excepto que el cetuximab se ha tratado con Endo S.

El conjugado triazol de 9-azido-NeuAc-cetuximab y N-(6-O-propargil-D-galactosil)-monometildolastatina 10 se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 6.

El conjugado de ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-trastuzumab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 16.

45 El conjugado de ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-anti-CD33 se debe entender que se refiere al conjugado, cuya preparación se describe en el Ejemplo 42. En el contexto de esta molécula, anti-CD33 se debe entender que se refiere a GCM011.

50 El conjugado de ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-afucosil trastuzumab se debe entender que se refiere al conjugado cuya preparación se describe en el Ejemplo 44, es decir, al conjugado mostrado en el Esquema 16 en que el trastuzumab es afucosilado.

El conjugado de MODO-TREA-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 17.

El conjugado de MODO-TRSLac-Lys-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 18.

55 El conjugado de DM1-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado

mostrado en el Esquema 19.

El conjugado de MODO-Val-Cit-PAB-DBCO-9-azido-NeuAc-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 20.

5 El conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-epirrubicins y 9-azido-NeuAc-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 21.

El conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-doxorubicina y 9-azido-NeuAc-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-epirrubicinas y 9-azido-NeuAc-cetuximab, en la que las epirrubicinas se reemplaza con doxorubicina.

10 El conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-daunorrubicina y 9-azido-NeuAc-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-epirrubicins y 9-azido-NeuAc-cetuximab, en la que las epirrubicinas se reemplaza con daunorrubicina.

El conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)duocarmicina, MA y 9-azido-NeuAc-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 22.

15 ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-cetuximab se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 16, en el que trastuzumab se reemplaza con cetuximab.

ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-GMC012 se debe entender que se refiere al conjugado mostrado en el Esquema 16, en la que el trastuzumab se reemplaza con GMC012.

20 En un ejemplo, D-L-G se selecciona del grupo que consiste en D-ácido aminooxiacético-7-aldehído-NeuAc, D-ácido aminooxiacético-7-aldehído-NeuAc, N-(6-N₃-Gal)-D-(triazol)-ABAA-ácido siálico oxima, N-(6-N₃-Gal)-D-(triazol)-ABAA-ácido siálico oxima, conjugado de triazol de 9-azido-NeuAc y N-(6-O-propargil-D-galactosil)-D, ABAA-D-7-aldehído-NeuNAc, D-TREA-DBCO-9-azido-NeuNAc, D-TRSLac-Lys-DBCO-9-azido-NeuNAc, D-DBCO-9-azido-NeuNAc, D-Val-Cit-PAB-DBCO-9-azido-NeuAc, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-D y 9-azido-NeuAc, en el que D es una molécula de carga útil tóxica. En esta realización, D puede ser cualquier molécula de carga útil tóxica descrita en este documento.

30 En un ejemplo, D-L-G se selecciona del grupo que consiste en monometildolastatin-ácido aminooxiacético-7-aldehído-NeuAc, monometilauristatina-ácido aminooxiacético-7-aldehído-NeuAc, N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico oxima, N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico oxima, conjugado de triazol de 9-azido-NeuAc y N-(6-O-propargil-D-galactosil)-monometildolastatina 10, ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc, MODO-TREA-DBCO-9-azido-NeuNAc, MODO-TRSLac-Lys-DBCO-9-azido-NeuNAc, DM1-DBCO-9-azido-NeuNAc, MODO-Val-Cit-PAB-DBCO-9-azido-NeuAc, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-epirrubicinas y 9-azido-NeuAc, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-doxorubicina y 9-azido-NeuAc, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)-daunorrubicina y 9-azido-NeuAc, conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)duocarmicina, MA y 9-azido-NeuAc, y conjugado de N-(6-O-propargil-D-galactosil)duocarmicina, y 9-azido-NeuAc.

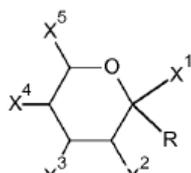
La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria, en la que el procedimiento comprende las etapas de:

40 proporcionar una glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor; y hacer reaccionar una molécula donante con la glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor en presencia de una glicosiltransferasa;

en la que la molécula donante está representada por la fórmula XI



en la que G es una estructura de sacárido representada por la fórmula XII



Fórmula XII

en la que

R es CMP, UDP o GDP;

X¹ es H o carboxilo;

5 X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L'; X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L';

a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L';

10 a condición de que cuando X¹ es carboxilo, entonces X² es H, X³ es OH, X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido; R es CMP; y X⁴ es un enlace a L' o X⁵ se une por medio de un enlace a L'; o

cuando X¹ es H, entonces R es UDP o GDP;

y en la que L' es D-L, en el que D es una molécula de carga

15 útil tóxica y L es un grupo ligador que une covalentemente G a D, o L' comprende F-E, en el que F es un grupo funcional que puede reaccionar con una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina, y E está ausente o una unidad de polietilenoxi de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en el que p es un número entero de 2 a aproximadamente 20.

La molécula donante puede comprender así un grupo funcional al que se puede conjugar un compuesto que comprende el grupo ligador y la molécula de carga tóxica en una etapa posterior.

20 El grupo funcional se puede seleccionar, por ejemplo, de modo que el producto del procedimiento, es decir, un conjugado de glicoproteína-molécula donante, se puede unir a una molécula que comprende el grupo ligador y la molécula de carga útil tóxica utilizando conjugación click tal como reacción de cicloadición azida-alquino catalizada con cobre (I) (CuAAC). También se puede utilizar la conjugación click, tal como la química de clics sin cobre.

25 En un ejemplo, L' es DL, en el que D es una molécula de carga útil tóxica y L es un grupo ligador que une covalentemente G a D. Esta realización tiene la utilidad adicional de que no son necesarias más etapas para la preparación del conjugado de glicoproteína-molécula de carga tóxica.

En un ejemplo, L' comprende F-E, en el que F es un grupo funcional que puede reaccionar con una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina, y E está ausente o una unidad de polietilenoxi de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en el que p es un número entero de 2 a aproximadamente 20. Esta realización tiene la utilidad adicional de que la molécula de carga útil tóxica se puede conjugar en una etapa posterior.

30 En un ejemplo, el grupo funcional que puede reaccionar con un amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina es una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina.

En un ejemplo, el grupo funcional es un ciclooctino o un derivado de este, tal como un grupo dibenzociclooctilo (DBCO).

35 En este contexto, la abreviatura "CMP" se debe entender que se refiere a monofosfato de citidina.

En este contexto, la abreviatura "UDP" se debe entender que se refiere a difosfato de uridina.

En este contexto, la abreviatura "GDP" se debe entender que se refiere a difosfato de guanidina.

En una realización, el procedimiento comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

proporcionar una glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor; y

hacer reaccionar una molécula donante con la glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor en presencia de una glicosiltransferasa;

en la que la molécula donante está representada por la fórmula XI descrita anteriormente.

La glicoproteína, en principio, puede ser cualquier glicoproteína descrita en este documento.

- 5 En este contexto, el término "sitio aceptor" se debe entender que se refiere a un residuo de sacárido del N-glicano al que se puede conjugar la molécula donante usando una glicosiltransferasa.

En principio, el N-glicano puede ser cualquier N-glicano descrito en este documento, con la condición que comprenda un sitio aceptor.

En este contexto, el término "un sitio aceptor" se debe entender que se refiere a uno o más sitios aceptores.

- 10 En una realización, el sitio aceptor es un sitio aceptor de sialiltransferasa o un residuo de GlcNAc unido por una unión β -N a una asparagina.

En un ejemplo, el sitio aceptor es un sitio aceptor de sialiltransferasa seleccionado del grupo que consiste en Gal β , Gal β 4GlcNAc, Gal β 3GlcNAc, Gal β 3GalNAc, GalNAc β , GalNAc α , Gal-NAc β 4GlcNAc y ácido siálico.

En un ejemplo, el sitio aceptor es un residuo de Gal β terminal.

- 15 En una realización, el sitio aceptor es un residuo de GlcNAc unido por una unión β -N a una asparagina.

En una realización, la glicoproteína comprende uno, dos, tres, cuatro o más N-glicanos que comprenden un sitio aceptor.

En una realización, la glicoproteína comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más sitios aceptores.

En una realización, el N-glicano comprende uno, dos o más sitios aceptores.

- 20 En una realización, el procedimiento comprende la etapa de proporcionar una composición que incluye una glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor.

En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de las glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden un N-glicano que comprende al menos un sitio aceptor.

- 25 En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99%, o esencialmente 100% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden al menos un sitio aceptor.

En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99%, o esencialmente 100% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden al menos dos N-glicanos que comprenden al menos un sitio aceptor.

- 30 En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden dos sitios aceptores.

En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden al menos un residuo de Gal β terminal.

- 35 En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden al menos dos N-glicanos que comprenden al menos un residuo de Gal β terminal.

En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden dos residuos de Gal β terminal.

- 40 En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden dos residuos de Gal β terminal.

En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden un N-glicano que consiste en la estructura representada por la fórmula IV.

- 45 En una realización, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden un N-glicano que consiste en la estructura representada por la fórmula IV.

En este contexto, el término "glicosiltransferasa" se debe entender que se refiere a cualquier enzima capaz de conjugar la molécula donante al sitio aceptor.

La glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa.

- 5 En un ejemplo, la glicosiltransferasa se selecciona del grupo que consiste en α 2,6-sialiltransferasas tales como ST6GAL1 humana; α 2,3-sialiltransferasas tales como α 2,3-N-sialiltransferasa de rata; galactosiltransferasas tales como β 1,4-GalT1 humana, β 1,4-GalT2 humana, β 1,4-GalT de leche bovina y β 1,4-GalT1 bovina; y N-acetilhexosaminiltransferasas tales como β 1,4-GalT1(Y285L) humana y β 1,4-GalT1(Y285L) bovina.

La glicosiltransferasa se selecciona del grupo que consiste en β 1,4-GalT1(Y285L) humana y bovine β 1,4-GalT1(Y289L).

- 10 En un ejemplo, X^1 es carboxilo, X^2 es H; X^3 es OH; X^4 es OH, H, amino, acilamida C_2-C_6 , o un enlace a L; X^5 es alquilo C_1-C_3 o alquilo C_1-C_3 sustituido; R es un enlace glicosídico al N-glicano; y X^4 es un enlace a L o X^5 se une por medio de un enlace a L.

En un ejemplo, X^1 es H y X^5 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L'.

- 15 En un ejemplo, X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-galacto y X^5 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L'.

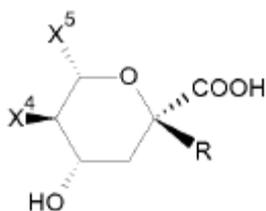
En un ejemplo, X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-gluco y X^5 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L'.

En un ejemplo, X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-galacto, X^3 y X^4 son grupos OH, y X^5 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L'.

- 20 En un ejemplo, X^1 es H, la estructura anomérica de G es de configuración β -D-galacto, X^2 y X^3 y X^4 son grupos OH, y X^5 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L'.

En un ejemplo, X^1 es H, la estructura anomérica de G es β -D-galacto o configuración β -D-gluco, X^2 es un grupo acetamido, X^3 y X^4 son grupos OH, y X^5 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L'.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula XIII



Formula XIII

- 25 en la que

R es CMP;

X^4 es OH, H, amino, acilamida C_2-C_6 , éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L';

X^5 es alquilo C_1-C_3 o alquilo C_1-C_3 sustituido;

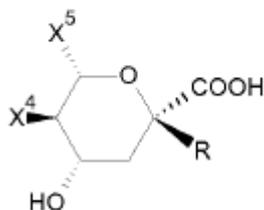
- 30 y X^4 es un enlace a L' o X^5 se une por medio de un enlace a L'; y

la glicosiltransferasa es una sialiltransferasa.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula XIII, en la que X^5 se une por medio de un enlace a L'. En un ejemplo, el enlace entre X^5 y L' es un enlace oxima. En un ejemplo, el enlace entre X^5 y L' es un enlace triazol.

- 35 Una sialiltransferasa adecuado puede ser, por ejemplo, ST6Gal1 α 2,6-sialiltransferasa humana o α 2,3-N-sialiltransferasa de rata.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula XIII



Fórmula. XIII

en la que

R es CMP;

X⁴ es OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L';

5 X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido;

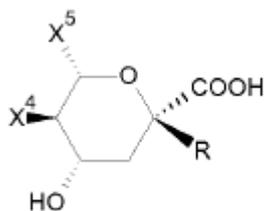
y X⁴ es un enlace a L' o X⁵ se une por medio de un enlace a L';

L' es D-L, en el que D es una molécula de carga útil tóxica y L es un grupo ligador que une covalentemente G a D; y

la glicosiltransferasa es una sialiltransferasa.

10 En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula XIII, en la que X⁵ se une por medio de un enlace a D-L, en el que D es una molécula de carga útil tóxica y L es un grupo ligador que une covalentemente G a D. En una realización, el enlace entre X⁵ y D-L es un enlace oxima. En una realización, el enlace entre X⁵ y D-L es un enlace triazol.

En un ejemplo, G es una estructura de sacárido representada por la fórmula XIII



Fórmula. XIII

15

en la que

R es CMP;

X⁴ es OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L';

X⁵ es alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido;

20 y X⁴ es un enlace a L' o X⁵ se une por medio de un enlace a L';

L' comprende F-E, en el que F es un grupo funcional que puede reaccionar con una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina, y E está ausente o una unidad de polietilenoxi de fórmula (CH₂CH₂O)_p, en la que p es un número entero de 2 a aproximadamente 20; y la glicosiltransferasa es una sialiltransferasa.

25 En un ejemplo, X⁵ es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L'.

En un ejemplo, X⁵ es CH(OH)CH(OH)CH₂X⁹, en la que X⁹ es un enlace a L'. En una realización, el enlace a L' es un enlace oxima. En una realización, el enlace a L' es un enlace triazol.

En un ejemplo, X^4 es un grupo acilamido C_2 tales como grupo acetamido, y X^5 es $CH(OH)CH(OH)CH_2X^9$, en la que X^9 es un enlace a L' . En una realización, el enlace a L' es un enlace oxima. En una realización, el enlace a L' es un enlace triazol.

5 En un ejemplo, X^4 es un grupo acilamido C_2 tales como grupo acetamido, y X^5 es $CH(OH)CH(OH)CH_2X^9$, en la que X^9 es un enlace a L' . En una realización, el enlace a L' es un enlace oxima. En una realización, el enlace a L' es un enlace triazol.

En un ejemplo, X^5 es CH_2X^7 , en la que X^7 es un enlace a L' . En una realización, el enlace a L' es un enlace oxima. En una realización, el enlace a L' es un enlace triazol.

10 En un ejemplo, X^4 es un grupo acilamido C_2 tales como grupo acetamido, y X^5 es CH_2X^7 , en la que X^7 es un enlace a L' . En una realización, el enlace a L' es un enlace oxima. En una realización, el enlace a L' es un enlace triazol. En un ejemplo, X^4 es un grupo acilamido C_2 tales como grupo acetamido, y X^5 es CH_2X^7 , en la que X^7 es un enlace a L' . En una realización, el enlace a L' es un enlace oxima. En una realización, el enlace a L' es un enlace triazol.

15 En un ejemplo, las estructuras descritas en la presente en las que X^5 es CH_2X^7 , en la que X^7 es un enlace a L' , se generan por oxidación leve con peryodato y escisión específica del enlace entre el ácido siálico C-7 y C-8. En un ejemplo, la oxidación leve de peryodato y la escisión específica del enlace entre el ácido siálico C-7 y C-8 se realiza como se expone en los Ejemplos de la presente invención. En un ejemplo, la oxidación leve de peryodato se realiza en la glicoproteína completa. En un ejemplo, la oxidación leve de peryodato se optimiza para que otros residuos de glicano no se oxiden. En un ejemplo, la oxidación leve de peryodato se optimiza para que otros grupos funcionales en la glicoproteína no se oxiden. En un ejemplo, la oxidación leve de peryodato se optimiza para que otros grupos funcionales en la glicoproteína no se oxiden.

20 En un ejemplo, X^4 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L' .

En un ejemplo, X^4 es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L' , y X^5 es $CH(OH)CH(OH)CH_2OH$.

En un ejemplo, X^4 es $NH(CO)n1'(CH_2)_{n2}X^{4'}(CH_3)n3'$, en la que $X^{4'}$ es un enlace a L' , $n1'$ es 0 o 1, $n2'$ es un número entero entre 1 y aproximadamente 6, y $n3'$ es 0 o 1. En una realización, X^5 es $CH(OH)CH(OH)CH_2OH$.

25 En un ejemplo, X^4 es $NHCOCH_2CH_2X^{4'}CH_3$, en la que $X^{4'}$ es un enlace a L' . En un ejemplo, las estructuras descritas en la presente memoria, en la que X^4 es $NHCOCH_2CH_2X^{4'}CH_3$, en la que $X^{4'}$ es un enlace a L' , se generan mediante la reacción del grupo carbonilo en $NH(C=O)CH_2CH_2COCH_3$. En un ejemplo, el enlace a L' es un enlace oxima.

30 En un ejemplo, la estructura anomérica del sustituyente X^5 en las estructuras de acuerdo con Fórmula XIII es como en el ácido neuramínico y como se expone en el Ejemplo 3.

En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se selecciona de acuerdo con los ensayos de estabilidad en suero o plasma en pH neutro y ensayos de hidrólisis en presencia de glicohidrolasa lisosómicas en pH ácido.

35 En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se selecciona de acuerdo con alta estabilidad en suero y plasma como se expone en el Ejemplo 15.

En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se selecciona de acuerdo con alta tasa de hidrólisis en presencia de glicohidrolasas lisosómicas en pH ácido como se expone en el Ejemplo 16.

40 En un ejemplo, la estructura anomérica de G y los sustituyentes X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se seleccionan de acuerdo con alta estabilidad en suero y plasma como se expone en el Ejemplo 15 y de acuerdo con la alta tasa de hidrólisis en presencia de glicohidrolasa lisosómicas en pH ácido como se expone en el Ejemplo 16.

En una realización, el N-glicano consiste en la estructura representada por la fórmula IV



Fórmula IV

en la que $(\beta-N-Asn)$ es una unión $\beta-N$ a una asparagina y y es 0 o 1.

En un ejemplo, el N-glicano consiste en la estructura representada por la fórmula IV



Fórmula IV

en la que (β -N-Asn) es una unión β -N a una asparagina y y es 0 o 1;

y en la que

X¹ es H;

5 X², X³ y X⁴ son cada uno de modo independiente OH, H, amino, acilamida C₂-C₆, éster de fosfato o sulfato, o un enlace a L'; X⁵ es CH₂OH, carboxilo, CH₃, H, alquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃ sustituido, o un enlace a L';

a condición de que un sustituyente seleccionado de X², X³, X⁴ y X⁵ es un enlace a L' o se une por medio de un enlace a L' ;

R es UDP; y

10 la glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa o una N-acetilhexosaminiltransferasa.

Las galactosiltransferasas adecuadas son por ejemplo, β 1,4-GalT1 humana, β 1,4-GalT2 humana, β 1,4-GalT de leche bovina o β 1,4-GalT1 bovina; y las N-acetilhexosaminiltransferasas adecuadas son por ejemplo β 1,4-GalT1(Y285L) humana y β 1,4-GalT1(Y289L) bovina.

La molécula donante es UDP-2-(2-azidoacetamido)-2-deoxi-Gal (UDP-GalNAz).

15 Se puede proporcionar cualquier glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende uno o más sitios aceptores.

En un ejemplo, la glicoproteína comprende naturalmente un N-glicano que comprende un sitio aceptor.

En un ejemplo, la glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor se produce en una línea celular adecuada.

20 La línea celular adecuada se puede modificar para producir N-glicanos que comprenden un mayor número o proporción de sitios aceptores.

Las células o líneas celulares que proporcionan glicoproteínas descritas en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, células de mamífero, líneas celulares de mamífero modificadas para producir N-glicanos que comprenden un número o proporción mayor de residuos de Gal β terminales en comparación con una línea celular no modificada (tales como las líneas celulares CHO optimizadas para galactosilación proporcionadas por ProBioGen AG, Suiza),
 25 las líneas celulares de mamíferos modificadas para producir N-glicanos que comprenden un menor número o proporción de residuos Gal β terminales en comparación con una línea celular no modificada (tal como líneas celulares CHO-S productoras de anticuerpos generadas en el Ejemplo 13), líneas celulares de mamífero modificadas para producir N-glicanos que comprenden cantidades reducidas de o esencialmente ninguna fucosa, y células fúngicas o de levadura o de levadura que se manipulan genéticamente para expresar, por ejemplo, endoglicosidasas (por ejemplo, como se describe en el documento WO 2010015722).

En una realización de la invención, la glicosilación en la línea celular que produce la glicoproteína se modifica mediante el uso de inhibidores de la glicosidasa. Un experto en la materia conoce numerosos inhibidores de la glicosidasa útiles para la invención y concentraciones efectivas para su aplicación en el medio de cultivo. En una
 35 realización, la fucosilación del núcleo de N-glicano de la glicoproteína es inhibida por un inhibidor de la fucosilación. En una realización, la fucosilación del núcleo de N-glicano se inhibe mediante la adición de aproximadamente 50 mM de 2-desoxi-2-fluoro-L-fucosa peracetilada al medio de cultivo de células CHO para producir sitios aceptores de acuerdo con la Fórmula IV en la que y es 0.

40 Todos los N-glicanos no comprenden un sitio aceptor; además, solo un subconjunto de N-glicanos presentes en muchas glicoproteínas comprende uno o más sitios aceptores adecuados. Para proporcionar una glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende uno o más sitios aceptores, una glicoproteína que comprende un N-glicano se puede recortar o modificar para comprender uno o más sitios aceptores adecuados.

La glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor se prepara mediante el contacto de una glicoproteína que comprende un N-glicano con una glicosidasa.

en la que y es 0 o 1; y m y n son cada uno de modo independiente 0 o 1.

En una realización, L' es F-E, y el procedimiento además comprende la etapa de:

hacer reaccionar un producto que se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con una o más realizaciones del procedimiento con un compuesto representado por la fórmula XIV

5 D-L-L" Fórmula XIV

en el que D es la molécula de carga útil tóxica;

L es el grupo ligador que une covalentemente L" a D; y

L" es una amina, tiol, azida, alqueno, alquino, aldehído, cetona, ácido carboxílico o hidroxilamina.

Una persona experta en la técnica es capaz de seleccionar cada uno de F y L "para que puedan reaccionar entre sí.

10 En el contexto del presente procedimiento, se debe entender que L se refiere a cualquier grupo ligador como se describió anteriormente.

En el contexto del presente procedimiento, se debe entender que la glicoproteína se refiere a cualquier glicoproteína como se describió anteriormente.

15 Además, la molécula de carga útil tóxica se debe entender que se refiere a cualquier molécula de carga útil tóxica como se definió anteriormente.

El procedimiento también puede comprender por ejemplo, una etapa de purificación del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína obtenido.

20 También se divulga una composición farmacéutica que comprende el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria.

25 La composición farmacéutica puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones de aceite/agua, agentes humectantes y liposomas. Las composiciones que comprenden tales portadores se pueden formular mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. La composición farmacéutica puede comprender además otros componentes tales como vehículos, aditivos, conservantes, otras composiciones farmacéuticas administradas simultáneamente, y similares.

En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones de la invención.

30 En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado de glicoproteína-molécula de carga útil tóxica o conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones de la invención.

35 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano se debe entender que se refiere al régimen de dosificación para modular el crecimiento de células cancerosas y/o tratar la enfermedad de un paciente. La cantidad terapéuticamente efectiva se puede seleccionar de acuerdo con una variedad de factores, que incluyen edad, peso, sexo, dieta y estado médico del paciente, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y las consideraciones farmacológicas, tales como la actividad, eficacia, farmacocinética y perfiles de toxicología del conjugado particular utilizado. La cantidad terapéuticamente efectiva también se puede determinar con referencia a textos médicos estándares, tales como el Physicians Desk Reference 2004. El paciente puede ser un animal, un mamífero o un ser humano. El paciente también puede ser hombre o mujer, y puede ser un bebé, un niño o un adulto.

45 En el contexto de esta divulgación, el término "tratamiento" o "tratar" se usa en el sentido convencional y significa asistir, cuidar y atender a un paciente con el objetivo de combatir, reducir, atenuar o aliviar una enfermedad o anomalía de la salud y mejorar las condiciones de vida deterioradas por esta enfermedad, como, por ejemplo, con una enfermedad de cáncer.

50 En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende una composición para, por ejemplo, administración oral, parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal o para inyección directa en el tejido. La administración de la composición farmacéutica se puede realizar de diferentes maneras, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica.

También se divulga un procedimiento para modular el crecimiento de una población celular que expresa una molécula diana, en el que el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones de la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención con la población celular.

En este contexto, el término "una población celular" se debe entender que se refiere a una o más poblaciones celulares.

En este contexto, el término "una molécula diana" se debe entender como cualquiera molécula diana definida anteriormente.

El conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano se puede poner en contacto *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo* con la población celular, por ejemplo, células cancerosas, que incluyen, por ejemplo, cáncer de la sangre, plasma, pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, cerebro, huesos, ovario, testículos y órganos linfáticos; más preferiblemente cáncer de pulmón, colon, próstata, plasma, sangre o colon; o en enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injerto, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra huésped; infecciones virales, tales como infección por CMV, infección por VIH y SIDA; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y similares; o, por ejemplo, células que expresan proteínas LRP-1 relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad tales como células de fibrosarcoma. La "modulación del crecimiento de las poblaciones celulares" incluye la inhibición de la proliferación de poblaciones celulares, por ejemplo, poblaciones de células tumorales (por ejemplo, poblaciones de células de mieloma múltiple, tales como células MOLP-8, células OPM2, células H929 y similares) de la división a producir más células; reducir la tasa de aumento en la división celular en comparación, por ejemplo, con células no tratadas; destruir poblaciones de células; y/o evitar que las poblaciones celulares (tales como las células cancerosas) formen metástasis. El crecimiento de las poblaciones celulares se puede modular *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

En un ejemplo, la población celular es una población celular de cáncer.

También se divulga el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria para uso como medicamento.

También se divulga el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria para usar en la terapia.

También se divulga el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria para usar en el tratamiento del cáncer.

También se divulga el uso del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria para la fabricación de un medicamento.

También se divulga el uso del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un ejemplo, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer escamoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer resistente a múltiples fármacos y cáncer testicular.

También se divulga un procedimiento para tratar y/o modular el crecimiento y/o la profilaxis de células tumorales en humanos o animales, en el que el conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano o la composición farmacéutica de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria se administra a un ser humano o animal en una cantidad efectiva.

En un ejemplo, las células tumorales se seleccionan del grupo que consiste en células de leucemia, células de linfoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer de ovario, células de cáncer colorrectal, células de cáncer gástrico, células de cáncer escamoso, células de cáncer de pulmón de células pequeñas, células de cáncer de cabeza y cuello, células cancerosas resistentes a múltiples fármacos y células de cáncer testicular, o células cancerosas metastásicas, avanzadas, resistentes a fármacos u hormonas o resistentes a múltiples fármacos, o versiones de las mismas

También se divulga un procedimiento para tratar cáncer en seres humanos o animales, en el que el conjugado de la

molécula de carga útil tóxica para glicoproteína o el conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria se administra a un ser humano o animal en una cantidad efectiva.

5 En un ejemplo, un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, un conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano o una composición farmacéutica de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria también se puede usar para tratar efectivamente los cánceres resistentes a fármacos, que incluye los cánceres resistentes a múltiples fármacos, "resistencia a múltiples fármacos", que significa la resistencia de las células cancerosas a más de un agente quimioterapéutico. La resistencia a múltiples fármacos se puede ayudar, por ejemplo, mediante una bomba transmembrana de glicoproteína P que reduce la concentración de fármacos en la
10 célula. Como se sabe en la técnica, la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia es uno de los problemas centrales en el tratamiento del cáncer. Ciertos cánceres, tales como el cáncer de próstata y de mama, se pueden tratar con terapia hormonal, es decir, con hormonas o fármacos antihormonas que retrasan o detienen el crecimiento de ciertos cánceres al bloquear las hormonas naturales del cuerpo. Tales cánceres pueden desarrollar resistencia, o ser intrínsecamente resistentes, a la terapia hormonal. La presente divulgación contempla además el
15 uso de un conjugado de molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, un conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano o una composición farmacéutica de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria en el tratamiento de estos cánceres "resistentes a hormonas" o "refractarios a hormonas".

20 En un ejemplo, un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, un conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano o una composición farmacéutica de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria, se usa en el tratamiento de versiones metastásicas, avanzadas, resistentes a fármacos o hormonas, o resistentes a múltiples fármacos, de tumores sólidos. En un ejemplo, un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína, un conjugado de la molécula de carga útil tóxica-glicano o una composición farmacéutica de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria se usa en el tratamiento de una leucemia, que incluye una leucemia metastásica, avanzada o resistente a fármacos o resistente a múltiples
25 fármacos, o una versión de la misma.

Las realizaciones de la invención descritas anteriormente en la presente memoria se pueden usar en cualquier combinación entre sí. Varias de las realizaciones se pueden combinar entre sí para formar una realización adicional de la invención. Un procedimiento con el que se relaciona la invención puede comprender al menos una de las realizaciones de la invención descritas anteriormente en la presente memoria.

30 El conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria tiene numerosas propiedades ventajosas.

El conjugado es altamente citotóxico.

35 El conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria comprende un resto de molécula de carga útil tóxica-glicano relativamente pequeño que se libera eficazmente dentro de las células. Además, el resto liberado es relativamente pequeño; los conjugados de molécula de carga útil de toxina pequeña tienden a ser más tóxicos que los conjugados de molécula de carga útil tóxica grande, por ejemplo, que comprende una estructura de núcleo de N-glicano de tipo complejo. El conjugado molécula de carga útil tóxica-glicano liberado del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína en las células es capaz de suministrar la molécula de la carga útil tóxica a las células y posteriormente
40 al citosol, el núcleo o el retículo endoplásmico.

Diversas realizaciones del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína comprenden un grupo ligador hidrófilo que comprende uno o más grupos hidroxilo. Dicho grupo ligador transmite una buena solubilidad en soluciones acuosas. El resto glicano del conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína también es relativamente bien soluble en soluciones acuosas.

45 El conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria es suficientemente estable frente a la degradación química o bioquímica durante la fabricación o en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en sangre, suero, plasma o tejidos.

50 El conjugado de la molécula de carga útil tóxica de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria aquí también es relativamente estable, por ejemplo, en condiciones reductoras, en pH bajo y dentro de las células, organelas celulares, endosomas y lisosomas.

55 El conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria, sin embargo, se puede escindir por ejemplo en condiciones reductoras, en pH bajo, o dentro de las células, organelas celulares, endosomas y lisosomas. Posteriormente, la molécula de carga útil tóxica se puede liberar en condiciones seleccionadas o en ubicaciones seleccionadas, como las células cancerosas diana. El conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con una o más realizaciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, se puede escindir por una hidrolasa lisosómica presente a niveles relativamente altos en las células cancerosas.

El procedimiento de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención permite conjugar las moléculas de carga útil tóxicas en sitios aceptores específicos en una glicoproteína. El conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína de acuerdo con una o más realizaciones de la presente divulgación tiene mejores propiedades farmacocinéticas en comparación con un conjugado al que una molécula de carga útil tóxica se conjuga aleatoriamente, por ejemplo debido a la conjugación de la molécula de carga útil tóxica con las cadenas laterales de aminoácidos aleatorias.

EJEMPLOS

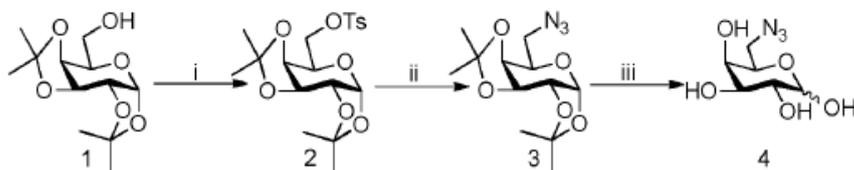
A continuación, la presente invención se describirá con más detalle. Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones de la presente invención, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. La descripción a continuación describe algunas realizaciones de la invención con tal detalle que una persona experta en la técnica puede utilizar la invención sobre la base de la divulgación. No todas las etapas de las realizaciones se discuten en detalle, ya que muchas de las etapas serán obvias para el experto en la materia sobre la base de esta memoria descriptiva.

Ejemplo 1. Síntesis de derivados de dolastatina

A menos que se indique lo contrario, los materiales se obtuvieron de proveedores comerciales con el mayor grado de pureza disponible y se usaron sin purificaciones adicionales. Los disolventes de reacción se secaron y destilaron antes de su uso cuando fue necesario. Todas las reacciones que contienen reactivos sensibles a la humedad o al aire se llevaron a cabo bajo una atmósfera de argón. La monometilauristatina F (MMAF) y la monometildolastatina 10 se adquirieron en Concortis (San Diego, CA, EE. UU.). Cianoborohidruro de sodio, hidruro de sodio (NaH), metanol, 4-bromo-1-butino, 5-yodo-1-pentino, 2-desoxi-D-glucosa, 66-O-(β -D-galacto-piranosil)-D-galactosa, diisopropiletilamina y ácido 2,5-dihidroxibenzoico se adquirieron en Sigma-Aldrich. El dimetilsulfóxido (DMSO) y la N,N-dimetilformamida (DMF) se adquirieron en VWR. 2-acetamido-2-deoxi-4-O-(β -D-galactopiranosil)-D-glucosa, N-{4-O-[4-O-(α -D-galactopiranosil)- β -D-galactopiranosil]-D-glucosa y 4-O-[3-O-(α -N-acetilneuraminil)- β -D-galactopiranosil]-D-glucosa eran de Kyowa Hakko Kogyo. El ácido trifluoroacético y el hidrógeno carbonato de amonio se adquirieron en Fluka, acetonitrilo (ACN) de J.T.Baker y glutarato de disuccinimidilo de Pierce. Los espectros de RMN se registraron con un espectrómetro Bruker Avance que funciona a 600,13 MHz (^1H : 600,13 MHz, ^{13}C : 150,90 MHz). Se utilizaron secuencias de pulsos proporcionadas por el fabricante. La temperatura de la sonda durante los experimentos se mantuvo a 22 °C a menos que se mencione lo contrario. Los desplazamientos químicos se expresan en la escala δ (en ppm) utilizando TMS (tetrametilsilano), cloroformo residual, acetona, H₂O o metanol como estándares internos. Las constantes de acoplamiento se dan en Hz y se proporcionan solo una vez cuando se encuentran por primera vez. Los patrones de acoplamiento se dan como s, singulete, d, doblete, t, triplete, etc. a TLC se realizó en láminas de aluminio prerrevestidas con gel de sílice 60 F254 (Merck). La cromatografía flash se realizó sobre gel de sílice 60 (0,040-0,060 mm, Aldrich). Las manchas se visualizaron por UV seguido de carbonización con H₂SO₄/MeOH y calentamiento

Esquema 1. Síntesis de 6-azido-6-deoxi-D-galactosa. i)

TsCl, piridina, RT, 22h, 81%; ii) NaN₃, DMF, 120°C, 68%; iii) 60% TFA, 50°C, 1h, cuantitativo



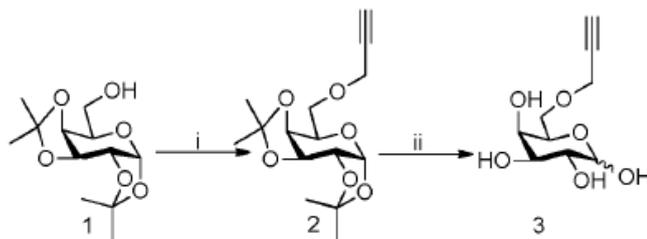
Síntesis de 1,2;3,4-di-O-isopropiliden-6-O-tosil- α -D-galactopiranososa (Esquema 1,2): 0,39 g (1,5 mmol) del (Esquema 1,1) se disolvieron en 5 ml de piridina seca bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 0,88 g (3,1 equiv) de TsCl. La reacción se calentó lentamente a RT y se agitó durante la noche. Después de 22 horas la reacción se diluyó con 30 ml de CH_2Cl_2 y se lavó con 30 ml de agua helada. La fase orgánica se lavó con 20 ml de 10% (p/v) de solución acuosa de CuSO_4 , 20 ml de solución saturada de NaHCO_3 y 20 ml H_2O . La fase orgánica se separó, se secó con Na_2SO_4 , se filtró y concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (Hexano:EtOAc 1:1) para proporcionar (Esquema 1,2) como un aceite amarillento (0,49 g, 81%). TLC: $R_f = 0,74$ (Hexano:EtOAc 1:1). ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3 , 22 °C): $\delta = 7,81$ -7,32 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2$), 5,45 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4,9$ Hz, H-1), 4,59 (dd, 1 H, $J_{3,2} = 2,5$, $J_{3,4} = 7,9$ Hz, H-3), 4,29 (dd, 1 H, H-2), 4,22-4,18 (m, 2 H, H-6a, H-4), 4,09 (dd, 1 H, $J_{6b,5} = 6,9$, $J_{6b,6a} = -10,3$ Hz, H-6b), 4,05 (ddd, 1 H, $J_{5,4} = 1,9$, $J_{5,6a} = 6,2$ Hz, H-5), 2,44 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2$), 1,50, 1,34, 1,31 y 1,28 (cada s, cada 3 H, $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

Síntesis de 1,2;3,4-di-O-isopropiliden-6-deoxi-6-azido- α -D-galactopiranososa (Esquema 1,3). A una solución que contiene 1,5 g (3,7 mmol) del (Esquema 1,2) en 20 ml de DMF seco (bajo una atmósfera de argón) se añadieron 1,7 g (7 equiv.) NaN_3 y la mezcla resultante se agitó a 120 °C durante la noche. Después de 18 horas, la mezcla de reacción se llevó a RT, se diluyó con 20 ml CHCl_3 , se filtró y concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (Hexano:EtOAc 3:1) para proporcionar (Esquema 1,3) como un aceite incoloro (0,7 g, 68%). TLC: $R_f = 0,52$ (Hexano:EtOAc 3:1). ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3 , 22 °C): $\delta = 5,55$ (d, 1 H, $J_{1,2} = 5,1$ Hz, H-1), 4,63 (dd, 1 H, $J_{3,2} = 2,5$, $J_{3,4} = 8,1$ Hz, H-3), 4,33 (dd, 1H, H-2), 4,19 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 2,0$ Hz, H-4), 3,92 (ddd, 1 H, $J_{5,6b} = 5,3$, $J_{5,6a} = 7,8$ Hz, H-5), 3,51 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = -12,9$ Hz, H-6a), 3,36 (dd, 1 H, H-6b), 1,55, 1,46, 1,35 y 1,34 (cada s, cada 3 H, $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

Síntesis de 6-azido-6-deoxi-D-galactosa (Esquema 1,4). 80 mg (0,3 mmol) del (Esquema 1,3) se disolvieron en 3 ml de TFA 60% y la mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 1 hora. La mezcla posteriormente se diluyó con agua y se concentró para proporcionar (Esquema 1,4) como un aceite incoloro (60 mg, cuantitativo, furanosa:piranososa 3:97, α piranososa: β piranososa 35:65). Datos de RMN seleccionados: ^1H RMN (600 MHz, D_2O , 22 °C): $\delta = 5,28$ (d, 1 H, $J_{1,2} = 4,7$ Hz, H-1_{furanosa}), 5,26 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3,9$ Hz, H-1 α piranososa), 5,22 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3,4$ Hz, H-1_{furanosa}), 4,60 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1 β piranososa).

Esquema 2. Síntesis de 6-O-propargil-D-galactosa i)

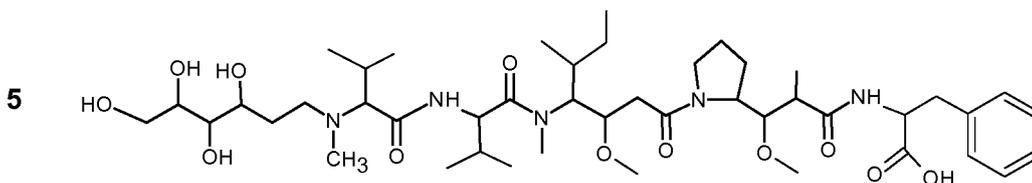
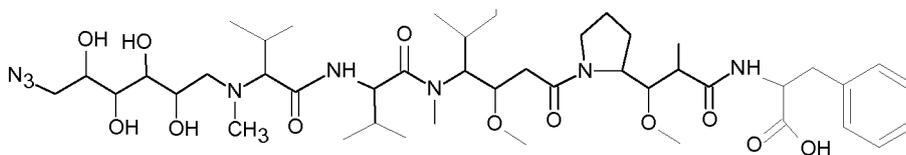
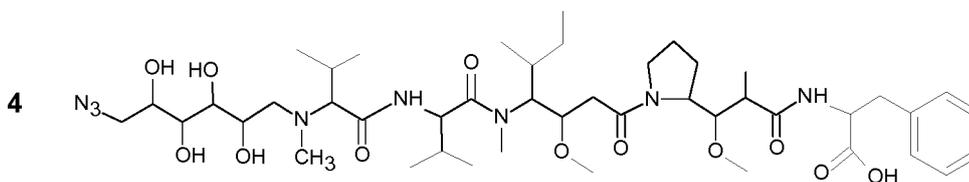
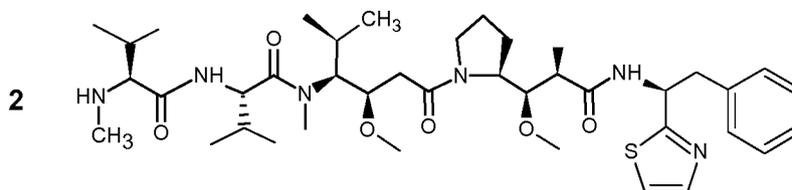
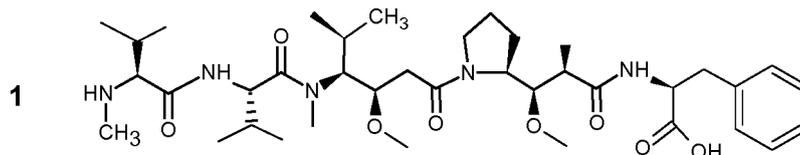
NaH, bromuro de propargilo DMF, RT, 3 h, 91%; ii) 60% TFA, 50 °C, 1 h, cuantitativo

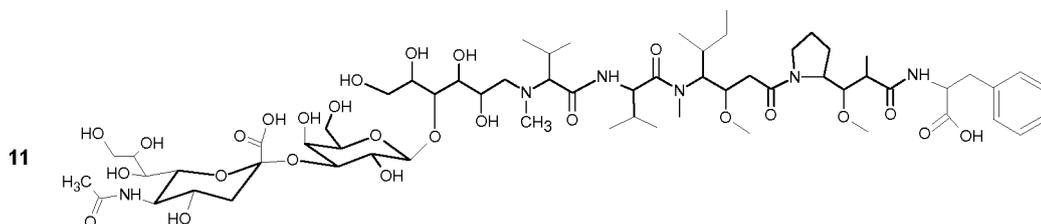
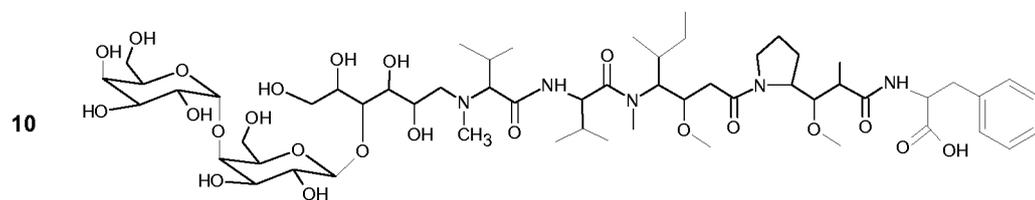
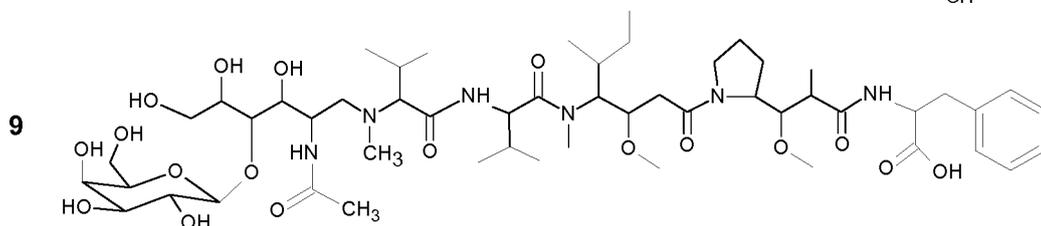
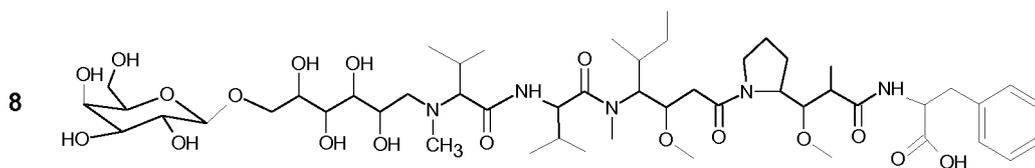
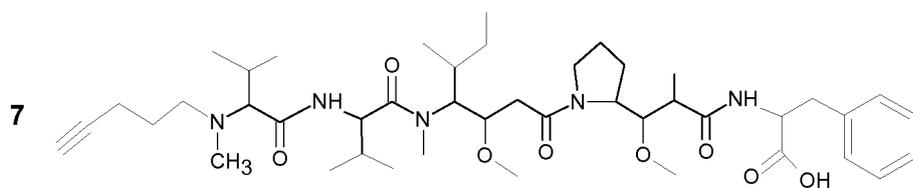
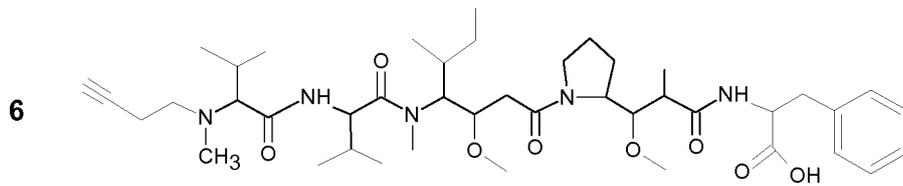


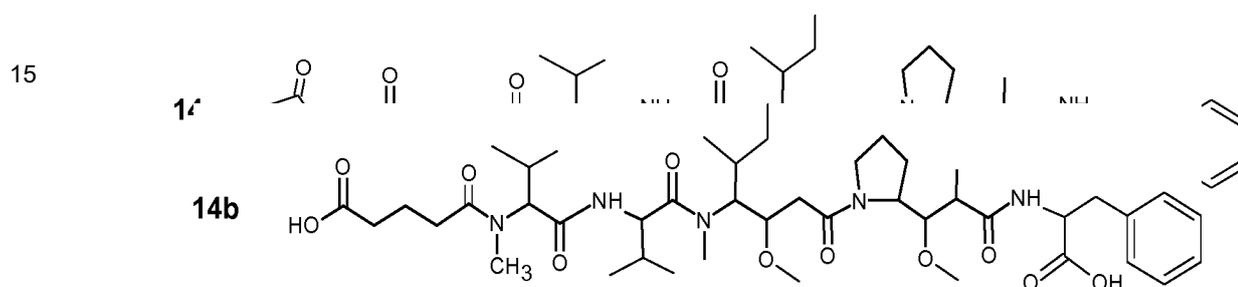
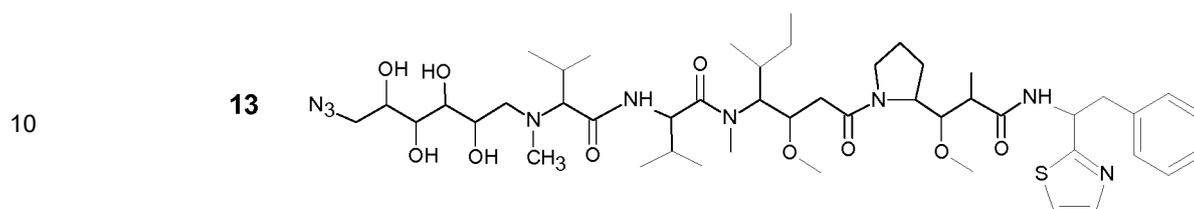
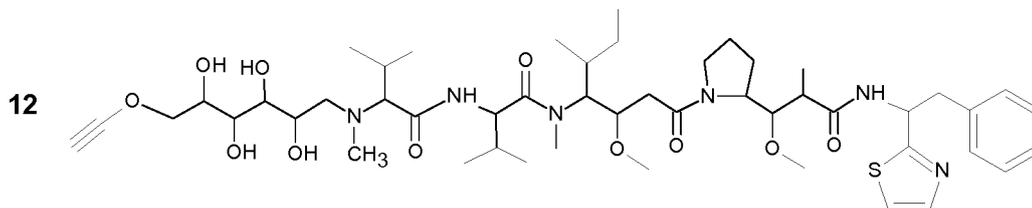
1,2;3,4-di-O-isopropiliden-6-O-propargil- α -D-galactopiranososa (Esquema 2,2). A una solución que contiene 0,27 g (1,0 mmol) 1 en 5 ml de DMF seco (bajo una atmósfera de argón) se añadieron 75 mg (2,0 equiv.) de NaH a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante 20 min. y se añadieron 171 ml (1,5 equiv.) de bromuro de propargilo. Después de 20 min la mezcla se llevó a RT y se agitó durante 2,5 horas adicionales. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se inactivó mediante la adición de MeOH (0,5 ml). La mezcla de reacción se llevó a RT, se diluyó con 20 ml de CH_2Cl_2 y se lavó con 20 ml de solución saturada de NaHCO_3 . La fase acuosa se extrajo con 20 ml de CH_2Cl_2 . La fase orgánica combinada se lavó con 20 ml de H_2O , se secó con Na_2SO_4 , se filtró y concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (Hexano:EtOAc 2:1) para proporcionar (Esquema 2,2) como un sólido blanco (0,27 g, 91%). TLC: $R_f = 0,77$ (Hexano:EtOAc 1:1). ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3 , 22 °C): $\delta = 5,54$ (d, 1 H, $J_{1,2} = 5,1$ Hz, H-1), 4,61 (dd, 1 H, $J_{3,2} = 2,5$, $J_{3,4} = 8,0$ Hz, H-3), 4,32 (dd, 1H, H-2), 4,26 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 1,9$ Hz, H-4), 4,25 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}2\text{a},\text{CH}} = 2,4$, $J_{\text{CH}2\text{a},\text{CH}2\text{b}} = -15,9$ Hz, $\text{CH}2\text{aC}\equiv\text{CH}$), 4,20 (dd, 1 H, $J_{\text{CH}2\text{b},\text{CH}} = 2,4$ Hz, $\text{CH}2\text{bC}\equiv\text{CH}$), 4,00 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 5,4$, $J_{5,6b} = 7,1$ Hz, H-5), 3,78 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = -10,1$ Hz, H-6a), 3,67 (dd, 1 H, H-6b), 2,43 (dd, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 1,55, 1,45, 1,34 y 1,33 (cada s, cada 3 H, $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

Síntesis de 6-O-propargil-D-galactosa (Esquema 2,3). Se disolvieron 25 mg (0,08 mmol) del (Esquema 2,3) en 3 ml de TFA 60% y la mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 1 hora. La mezcla posteriormente se diluyó con agua y se concentró para proporcionar (Esquema 2,3) como un aceite incoloro (18 mg, cuantitativo, furanosa:piranosa 3:97, alfa_{piranosa}:beta_{piranosa} 35:65). Datos de RMN seleccionados: ¹H RMN (600 MHz, D₂O, 22 °C): δ = 5,26 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 4,7 Hz, H-1_{furanosa}), 5,23 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3,8 Hz, H-1_{αpiranosa}), 5,20 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3,5 Hz, H-1_{furanosa}), 4,55 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7,9 Hz, H-1_{βpiranosa}).

Se prepararon los siguientes derivados de MMAF (1) y monometildolastatina 10 (2)(3-14):







20 N-(6-O-propargil-D-galactosil)-MMAF (3): cianoborohidruo de sodio (200 μmol) y 6-O-propargil-D-galactosa (45 μmol) se añadieron a la solución de MMAF (2,7 μmol) en dimetilsulfóxido (0,7 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante tres días.

25 N-(6-azido-6-deoxi-D-galactosil)-MMAF (4): cianoborohidruo de sodio (160 μmol) y 6-azido-6-deoxi-D-galactosa (95 μmol) se añadieron a la solución de MMAF (2,7 μmol) en DMSO (0,6 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante tres días.

N-(2-deoxi-D-glucosil)-MMAF (5): cianoborohidruo de sodio (28 μmol) y 2-deoxi-D-glucosa (21 μmol) se añadieron a la solución de MMAF (1,4 μmol) en DMSO (0,6 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante tres días.

30 N-(3-butinil)-MMAF (6): a la solución de MMAF (2,7 μmol) en DMF seco (0,6 ml) se añadió NaH (54 μmol) y 4-bromo-1-butino (27 μmol). La mezcla se agitó a 60 °C durante 4 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de metanol seco (0,2 ml).

N-(4-pentinil)-MMAF (7): a la solución de MMAF (1,4 μmol) en DMF seco (0,4 ml) se añadió NaH (7 μmol) y 5-yodo-1-pentino (7 μmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de metanol seco (0,2 ml).

35 N-[6-O-(β -D-galactopiranosil)-D-galactosil]-MMAF (8): cianoborohidruo de sodio (25 μmol) y 6-O-(β -D-galactopiranosil)-D-galactosa (5,3 μmol) se añadieron a la solución de MMAF (0,7 μmol) en DMSO (0,25 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante cinco días.

N-[2-acetamido-2-deoxi-4-O-(β -D-galacto-piranosil)-D-glucosil]-MMAF (9): cianoborohidruo de sodio (50 μmol) y 2-acetamido-2-deoxi-4-O-(β -D-galactopiranosil)-D-glucosa (11 μmol) se añadieron a la solución de MMAF (1,4 μmol) en DMSO (0,4 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante cinco días.

40 N-{4-O-[4-O-(α -D-galactopiranosil)- β -D-galactopiranosil]-D-glucosil}-MMAF (10): cianoborohidruo de sodio (50 μmol) y 4-O-[4-O-(α -D-galactopiranosil)- β -D-galactopiranosil]-D-glucosa (11 μmol) se añadieron a la solución de MMAF (1,4 μmol) en DMSO (0,4 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante cinco días.

N-[4-O-[3-O-(α -N-acetilneuraminil)- β -D-galactopiranosil]-D-glucosil]-MMAF (11): cianoborohidruo de sodio (50 μmol) y 4-O-[3-O-(α -N-acetil-neuraminil)- β -D-galactopiranosil]-D-glucosa (11 μmol) se añadieron a la solución de MMAF

(1,4 μmol) en DMSO (0,4 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante cinco días.

N-(6-O-propargil-D-galactosil)-dolastatina 10 (12): cianoborohidruro de sodio (200 μmol) y 6-O-propargil-D-galactosa (45 μmol) se añadieron a la solución de momometildolastatina 10 (2,5 μmol) en DMSO (0,7 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante tres días.

- 5 N-(6-azido-6-deoxi-D-galactosil)-dolastatina 10 (13): cianoborohidruro de sodio (160 μmol) y 6-azido-6-de-oxi-D-galactosa (95 μmol) se añadieron a la solución de momometildolastatina 10 (2,5 μmol) en DMSO (0,6 ml). La mezcla se agitó a 60 °C durante tres días.

- 10 N-(N-hidroxisuccinimidilglutaril)-MMAF (14): glutarato de disuccinimidilo (20 μmol) y diisopropiletilamina (20 μmol) se añadieron a la solución de MMAF (1,4 μmol) en ACN (0,4 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para producir N-glutaril-MMAF (14b), una alícuota de (14) se hidrolizó en solución acuosa.

Los productos se purificaron mediante un instrumento HPLC purificador Äkta purificador 10 (GE Healthcare) con una columna de fase inversa Gemini-NX-5u C-18 (4,6 x 250 mm, 110 Å (Phenomenex)) se eluyó con gradiente de ACN en hidrógeno carbonato de amonio acuoso o ácido trifluoroacético acuoso.

- 15 Por ejemplo, el N-(2-desoxi-D-glucosil)-MMAF (5) se eluyó con una concentración de ACN más baja a los 19,6 min (aproximadamente 37% de ACN) antes de ambos MMAF originales (1) a 21,7 min (aproximadamente 40% de ACN) y N-(3-butinil)-MMAF (6) a 26,0 min (aproximadamente 45% de ACN), lo que demuestra que era más hidrófilo.

- 20 Los espectros de masas del desorción-ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se registraron en un espectrómetro de masas Bruker Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) usando una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (3) m/z = 956 [M+Na], (4) m/z = 943 [M+Na], (5) m/z = 902 [M+Na], (6) m/z = 806 [M+Na], (7) m/z = 820 [M+Na], (8) m/z = 1080 [M+Na], (9) m/z = 1121 [M+Na], (10) m/z = 1242 [M+Na], (11) m/z = 1371 [M+Na], (12) m/z = 995 [M+Na], (13) m/z = 982 [M+Na], (14) m/z = 868 para NHS hidrolizado [M+Na].

Ejemplo 2. Citotoxicidad *in vitro* de los derivados de dolastatina

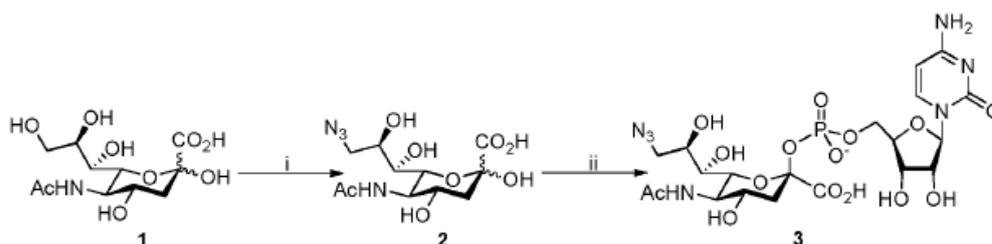
- 25 La línea celular de cáncer de ovario humano SKOV-3 provino de ATCC (Manassas, Virginia, USA). Las células se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se recogieron cultivos en fase logarítmica y se sembraron 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Se realizaron diluciones seriadas de las moléculas de prueba a partir de una solución madre de 100 μM en DMSO 10% en medio de cultivo celular, se añadieron a las células (la concentración máxima de dimetilsulfóxido fue 1%) y los cultivos se incubaron adicionalmente durante 96 h. La viabilidad celular se evaluó utilizando el reactivo de viabilidad celular PrestoBlue (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). De acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 2 h, y la reducción de colorante se midió por absorbancia a 570 nm. Los compuestos se analizaron 1-2 veces por triplicado.

- 35 Los resultados de un ensayo ejemplar se muestran en la Figura 1, en la que la numeración de los compuestos está de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados se expresan en la Tabla 1 como valores de IC₅₀ de los derivados analizados. En conclusión, 1) todos los derivados de alquilo analizados de MMAF y dolastatina 10 fueron citotóxicos contra las células de cáncer de ovario SKOV-3; 2) los derivados de monosacáridos 3, 4 y 5 fueron igual o solo un poco menos citotóxicos que 1, y los derivados de monosacáridos 13 y 14b fueron igualmente o solo un poco menos citotóxicos que 2, lo que demuestra que los conjugados de amina de sacáridos y MMAF o monometildolastatina 10 han conservado la capacidad para unirse a la tubulina; 3) los derivados de oligosacáridos 8, 11 y 12 fueron menos citotóxicos que 1 cuando se aplicaron al medio de cultivo celular, lo que refleja su alta hidrofiliidad y su capacidad reducida para pasar a través de las membranas celulares; y 4) el derivado de alquilo hidrófobo 6 era más citotóxico que 1, lo que demuestra que un ligador hidrófobo aumenta la capacidad del conjugado para pasar a través de las membranas celulares.

- 45 Tabla 1. Citotoxicidad de derivados de dolastatina. 1) Los valores de IC₅₀ se determinaron como el intervalo de concentración en el que la viabilidad de células de cáncer de ovario SKOV-3 cae al 50%. 2) El intervalo medido fue entre 1 nM-10 μM .

Compuesto	IC50 ¹⁾
1	0,1-1 μM
14b	0,1-1 μM
3	0,1-10 μM
4	0,1-1 μM
5	1 μM
6	<1 nM ²⁾
8	1-10 μM
10	1-10 μM
11	>10 μM ²⁾
2	<1 nM ²⁾
12	1 nM
13	<1 nM ²⁾

Ejemplo 3. Síntesis de CMP-9-deoxi-9-azido-NeuNAc



Esquema 3. i) 1) MeOH, AG 50W-X8 (forma H⁺). 45°C, o/n, cuantitativo; 2) TsCl, piridina, 0°C→RT, o/n, 67%; 3) NaN₃, Acetona:H₂O 3:1, 75°C, o/n, 52%; ii) CMP-sintetasa de ácido siálico CTP.

5 Ácido 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico (2): A una solución que contiene 63 mg de 1 (0,2 mmol) en 5 ml de MeOH seco (bajo argón) se añadieron 127 mg de AG 50W-38 (2 equiv en peso) y la mezcla resultante se agitó a 45 °C o/n. La mezcla posteriormente se filtró y concentró para proporcionar neuraminato de metil N-acetilo como un sólido blanco (65 mg, cuantitativo). TLC: *R_f* = 0,43 (DCM:MeOH 3:1).

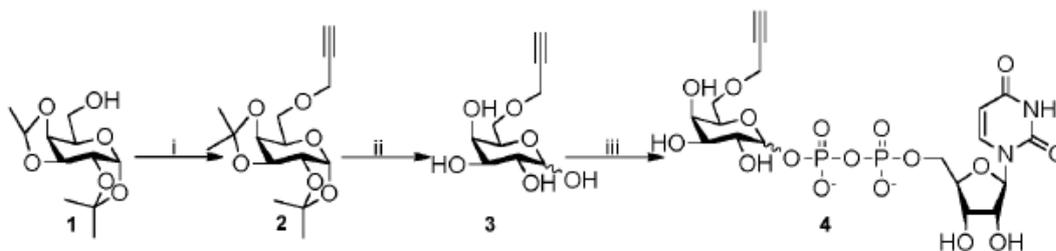
10 157 mg de neuraminato de metil N-acetilo (0,49 mmol) se disolvieron en 5 ml de piridina seca (bajo argón) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadieron 135 mg de TsCl (0,7 mmol, 1,4 equiv.) y la mezcla de reacción se calentó lentamente a RT y se dejó agitar o/n. Después de 23 horas se añadieron 134 mg de TsCl (0,7 mmol, 1,4 equiv.) a la mezcla de reacción y se agitó durante 2 horas adicionales a RT. La mezcla posteriormente se enfrió a 0 °C y la reacción se inactivó con MeOH. La mezcla se concentró y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna (MeOH:DCM 1:9) para proporcionar 9-O-tosil-N-acetil-neuraminato de metilo como un aceite amarillento (159 mg, 67%). TLC: *R_f* = 0,29 (DCM:MeOH 9:1). ¹H RMN (600MHz, CD₃OD, 22 °C): δ Datos de RMN seleccionados; 7,80-7,43 (m, 4 H, CH₃C₆H₄SO₂), 4,28 (dd, 1 H, *J* = 2,2, 10,1 Hz), 4,06-3,99 (m, 2 H), 3,93 (dd, 1 H, *J* = 1,5, 10,6 Hz), 3,85 (ddd, 1 H, *J* = 2,0, 5,7, 8,5 Hz), 3,77 (s, 3 H, CO₂CH₃), 4,43 (dd, 1 H, *J* = 1,5, 9,0 Hz), 2,46 (s, 3 H, CH₃C₆H₄SO₂), 2,19 (dd, 1 H, *J* = 4,9, 12,9 Hz, H-3eq), 2,00 (s, 3 H, NHCOCH₃), 1,86 (dd, 1 H, *J* = 11,5, 12,9 Hz, H-3ax). HRMS: calculado para C₁₉H₂₇O₁₁NNaS [M+Na]⁺ 500,12; experimental 500,20.

20 110 mg de 9-O-tosil-N-acetil-neuraminato de metilo (0,23 mmol) se disolvieron en 2 ml de acetona:H₂O 3:1 y se añadieron 70 mg de NaN₃ (1,1 mmol, 4,3 equiv.). La mezcla resultante se calentó a 75 °C y se agitó o/n. La mezcla de reacción posteriormente se concentró y el producto bruto se purificó por cromatografía de filtración en gel para proporcionar 2 como una espuma amarillenta (40 mg, 52%). Datos de RMN seleccionados; ¹H RMN (600MHz, D₂O, 22 °C): δ 4,03 (ddd, 1 H, *J* = 5,1, 10,1, 10,3 Hz), 3,99 (dd, 1 H, *J* = 0,9, 10,6 Hz), 3,94-3,89 (m, 2 H), 3,61 (dd, 1 H, *J* = 2,8, 13,1 Hz), 3,53 (ap d, 1 H, *J* = 9,4 Hz), 3,49 (dd, 1 H, *J* = 6,0, 13,1 Hz), 2,22 (dd, 1 H, *J* = 4,9, 12,9 Hz, H-3eq), 2,07 (s, 3 H, NHCOCH₃), 1,83 (dd, 1 H, *J* = 11,7, 12,9 Hz, H-3ax). HRMS: calculado para C₁₁H₁₈O₈N₄Na [M+Na]⁺

357,10; experimental 357,12; calculado para $C_{11}H_{18}O_8N_4Na$ $[M+2Na-H]^+$ 379,08; experimental 379,10.

Ácido citidina-5'-monofosfo-5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico (CMP-9'-azido-NeuAc) (3): La síntesis enzimática de CMP-9'-azido-NeuAc se realizó en 2 ml de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,5 que contiene $MgCl_2$ 20 mM, CTP 15 mM, 10 mg (15 mM) de 9'-azido-NeuAc y 100 mU de CMP-sintetasa de ácido siálico CMP (Sigma Aldrich). Todos los reactivos excepto 9'-azido-NeuAc fueron de origen comercial. La reacción se dejó proceder durante 2,5 horas a 37 °C. Después de 1 hora, se añadió CTP para alcanzar la concentración final de CTP de 30 mM y el pH se ajustó a 8,5 con NaOH. La reacción se controló en los puntos de tiempo 1 h y 2,5 h tomando muestras para análisis MALDI-TOF MS. Los análisis MALDI-TOF MS se realizaron utilizando 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THAP) como matriz en modo de ión negativo reflector con el instrumento Bruker Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemania). Después de 2,5 horas, la enzima se eliminó de la mezcla haciendo pasar la mezcla de reacción a través de la columna Bond Elute C_{18} (Varian Inc.). La muestra de CMP-9'-azido-NeuAc-eluida de la columna Bond Elute se purificó por cromatografía de filtración en gel con columna de péptido Superdex (GE Healthcare) usando bicarbonato de amonio 0,1 M como eluyente. Dos corridas cromatográficas consecutivas produjeron una muestra que contiene principalmente CMP-9'-azido-NeuAc con una proporción menor de CTP como se ejemplifica por el espectro MALDI en la Fig 2: CMP-9'-azido-NeuAc, m/z 637; CTP, m/z 479. El rendimiento final de CMP-9'-azido-NeuAc basado en la absorbancia a 280 nm (contra el estándar CTP) fue de 5,7 mg.

Ejemplo 4. Síntesis de UDP-6-O-propargil-galactosa



Esquema 4. i) NaH, bromuro de propargilo DMF, RT, 3 h, 91%; ii) 60% TFA, 50 °C, 1 h, cuantitativo; iii) 1) TMSCl, piridina, 0 °C → RT, 2 h, 54 %; 2) a) TMSI, DCM, 0 °C, 1 h; b) UDP, -30 °C, 1 h, después 0 °C, 2 h, después Bu_4NF , THF, RT, 1 h, 33 %.

1,2,3,4-di-O-isopropilideno-6-O-propargil- α -D-galactopiranosil-1-uridilidifosfato (2): A una solución que contiene 0,27 g (1,0 mmol) 1 en 5 ml de DMF seco (bajo una atmósfera de argón) se añadieron 75 mg (2,0 equiv) NaH a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante 20 min y se añadieron 171 ml (1,5 equiv) de bromuro de propargilo. Después de 20 min la mezcla se llevó a RT y se agitó durante 2,5 horas adicionales. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se inactivó durante la adición de MeOH (0,5 ml). La mezcla de reacción se llevó a RT, se diluyó con 20 ml de CH_2Cl_2 y se lavó con 20 ml solución saturada de $NaHCO_3$. La fase acuosa se extrajo con 20 ml de CH_2Cl_2 . La fase orgánica combinada se lavó con 20 ml de H_2O , se secó con Na_2SO_4 , se filtró y concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (Hexano:EtOAc 2:1) para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (0,27 g, 91%). TLC: R_f = 0,77 (Hexano:EtOAc 1:1). 1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$, 22 °C): δ = 5,54 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 5,1 Hz, H-1), 4,61 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ = 2,5, $J_{3,4}$ = 8,0 Hz, H-3), 4,32 (dd, 1 H, H-2), 4,26 (dd, 1 H, $J_{4,5}$ = 1,9 Hz, H-4), 4,25 (dd, 1 H, $J_{CH2a,CH}$ = 2,4, $J_{CH2a,CH2b}$ = -15,9 Hz, $CH2aC\equiv CH$), 4,20 (dd, 1 H, $J_{CH2b,CH}$ = 2,4 Hz, $CH2bC\equiv CH$), 4,00 (ddd, 1 H, $J_{5,6a}$ = 5,4, $J_{5,6b}$ = 7,1 Hz, H-5), 3,78 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = -10,1 Hz, H-6a), 3,67 (dd, 1 H, H-6b), 2,43 (dd, 1 H, $CH_2C\equiv CH$), 1,55, 1,45, 1,34 y 1,33 (cada s, cada 3 H, $O_2C(CH_3)_2$) ppm.

6-O-propargil-D-galactosa (3): 25 mg (0,08 mmol) de 2 se disolvieron en 3 ml de TFA 60% y la mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 1 hora. La mezcla posteriormente se diluyó con agua y se concentró para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (18 mg, cuant., furanosa:piranosil 3:97, $\alpha_{piranosil}:\beta_{piranosil}$ 35:65). Datos de RMN seleccionados: 1H RMN (600 MHz, D_2O , 22 °C): δ = 5,26 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 4,7 Hz, H-1_{furanosa}), 5,23 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 3,8 Hz, H-1 $\alpha_{piranosil}$), 5,20 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 3,5 Hz, H-1_{furanosa}), 4,55 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 7,9 Hz, H-1 $\beta_{piranosil}$).

6-O-propargil-D-galactopiranosil-1-uridilidifosfato (4): A una solución que contiene 73 mg (0,33 mmol) de 3 en 4 ml de piridina seca (bajo atmósfera de argón) se añadieron 0,25 ml (2,0 mmol, 6 equiv) de TMSCl a 0 °C. La mezcla resultante se llevó lentamente a RT y se agitó durante 1,5 horas. La mezcla se diluyó con 20 ml de pentano y se lavó con 6 ml (5 3) de H_2O . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y concentró para proporcionar 6-O-propargil-1,2,3,4-tetra-O-trimetilsilil-D-galactopiranosil-1-uridilidifosfato (TLC: R_f = 0,80 [Hexano:EtOAc 6:1]) como un aceite incoloro (92 mg, 54 %). Se disolvieron 92 mg (0,18 mmol) de 6-O-propargil-1,2,3,4-tetra-O-trimetilsilil-D-galactopiranosil-1-uridilidifosfato en 2 ml de DCM seco (bajo una atmósfera de argón) y 26 ml (0,18 mmol, 1 equiv.) Se añadió TMSI a 0 °C. La mezcla resultante

se agitó durante 1 hora y media de la cantidad (1 ml) se transfirió a un matraz separado. La solución restante se enfrió a -30 °C, se agitó durante 15 minutos y se añadieron 80 mg (0,09 mmol, 1 equiv) de UDP (como su forma de sal Bu₄N⁺) disuelta en 1 ml de DCM. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a -30 °C, posteriormente se llevó lentamente a 0 °C y se agitó durante 3 horas adicionales. El producto posteriormente se desprotegió mediante la adición de 0,15 ml de Bu₄NF (solución 1 M en THF). La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a RT y se concentró para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó por cromatografía de filtración en gel para proporcionar el compuesto del título (18 mg, 33 %, alfa:beta 30:70). Datos de RMN seleccionados: ¹H RMN (600 MHz, D₂O, 22 °C): δ = 5,64(dd, 1 H, *J*_{1,2} = 3,0, 3*J*_{1,P} = 6,9 Hz, H-1α), 4,97 (t, 1 H, *J*_{1,2} = 8,0, 3*J*_{1,P} = 8,0 Hz, H-1β). HRMS: calculado para C₁₈H₂₅N₂O₁₇P₂[M-H]⁻ 603,06; experimental 603,07.

10 Ejemplo 5. Síntesis enzimática de sacáridos modificados con azido-y propargilo

El hexasacárido Gal-NAzβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc (GalNAz, N-(2-azido)acetil-D-galactosamina) se preparó con una reacción enzimática usando UDP-GalNAz (Invitrogen) y pentasacárido GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glc (GNLN Lac) de la siguiente manera: UDP-GalNAz y GNLNLac se mezclaron con tampón MOPS pH 7,2 y MnCl₂. Se añadió enzima bovina GalT1 (Y289L) (Invitrogen) a la mezcla de reacción y se mezcló suavemente. La cantidad de enzima y las concentraciones finales de los componentes son las siguientes:

10 µl GalT1 bovina (Y289L)

50 mM MOPS, pH 7,2

20 mM MnCl₂

0,15 mM GNLNLac

10 µg UDP-GalNAz

Volumen total 20 ml

Las muestras se incubaron a +37 °C durante la noche.

La mezcla de reacción se purificó con columnas de 150 mg/4 ml Carbograph Extract-Clean (Grace Davison Discovery Sciences) y se eluyó con ACN 25% en TFA acuoso 0,05%. Las muestras eluidas se secaron en un evaporador centrífugo antes del almacenamiento.

Las muestras se analizaron con el modo positivo MALDI-TOF usando DHB (ácido 2,5-dihydroxibenzoico) como matriz. El espectro de masas mostró que no estaba presente ningún aceptor de pentasacáridos GNLNLac (933,4 m/z) y la reacción así se completó. Los picos de producto en m/z 1177,549 y m/z 1421,623 indicaron la adición de una y dos unidades GalNAz al glicano aceptor, respectivamente, lo que demuestra que el sacárido aceptor fue modificado efectivamente por los grupos azido.

El hexasacárido 6-propargilgalactosa-GNLNLac se preparó con una reacción enzimática usando UDP-6-propargilgalactosa (UDP-PrGal) y pentasacárido GNLNLac como sigue: GNLNLac y UDP-PrGal se mezclaron con tampón MOPS pH 7,2 y MnCl₂. Se añadió la enzima GalT de leche bovina (Calbiochem) o la enzima GalT1 humana (Y285L) (R&D Systems) a la mezcla de reacción y se mezcló suavemente. Las cantidades de enzimas y las concentraciones finales de componentes fueron las siguientes:

100 mU leche bovina GalT 0,2 µg GalT1 humana (Y285L)

50 mM MOPS, pH 7,2

50 mM MOPS, pH 7,2

20 mM MnCl₂

20 mM MnCl₂

0,3 mM GNLNLac

0,3 mM GNLNLac

10 mM UDP-PrGal

10 mM UDP-PrGal

Volumen total 20 µl

Volumen total 10 µl

Las muestras se incubaron a +37 °C durante la noche.

Los productos de reacción se purificaron con columnas de 150 mg/4 ml Carbograph Extract-Clean (Grace Davison Discovery Sciences) y se eluyeron con ACN 25% en TFA acuoso 0,05%. Las muestras eluidas se secaron en un evaporador centrífugo antes del almacenamiento.

Las muestras se analizaron con MALDI-TOF MS en modo positivo usando DHB (ácido 2,5-dihydroxibenzoico) como matriz. El espectro de masas de los productos de reacción purificados de la reacción con GalT de leche bovina mostró señales importantes en m/z 1133,549, m/z 1333,627 y m/z 1533,688, que representan productos con una, dos y tres unidades de propargilgalactosa unidas al pentasacárido aceptor, respectivamente, lo que muestra que el

5

Ejemplo 6. Generación de unidades GlcNAc(β -N-Asn) en glicoproteínas

Transferrina

Los N-glicanos del complejo biantenarico de la transferrina bovina (Sigma) se truncaron en unidades GlcNAc individuales por digestión con endo- β -N-acetilglucosaminidasa F2 según las instrucciones del proveedor de la enzima (Endo F2 de *Elizabethkingia miricola*, Calbiochem). En resumen, se incubaron 300 μ g de transferrina bovina con 30 mU de Endo F2 en 50 μ l de acetato de sodio 50 mM, pH 4,5, durante aprox. 24 h a 37 °C. El análisis MALDI-TOF MS del producto de reacción implicó que aprox 40% de los N-glicanos se convirtieron en unidades GlcNAc(β -N-Asn) individuales.

10

ARNasa B

Los N-glicanos con alta manosa de la ARNasa B bovina (Sigma) se truncaron en unidades de GlcNAc únicas por digestión con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H, según las instrucciones del proveedor de la enzima (Endoglucosidasa H de *Streptomyces plicatus*, Calbiochem). En resumen, se incubaron 200 μ g de ARNasa B bovina con 20 mU de Endo H en 50 μ l de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, durante aprox. 24 h a 37 °C. El análisis MALDI-TOF MS del producto de reacción mostró la conversión completa de N-glicanos en unidades GlcNAc (β -N-Asn) individuales.

15

20

Trastuzumab

Los N-glicanos complejos del dominio Fc del anticuerpo trastuzumab (Roche) se truncaron en unidades GlcNAc individuales por digestión con endo- β -N-acetilglucosaminidasa S según las instrucciones del proveedor de enzimas (IgGZERO, Genovis). En resumen, se incubaron 8 mg de anticuerpo con 1000 U de Endo H en 1050 μ l de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, durante 4 h a 37 °C. El análisis SDS-PAGE del producto de reacción mostró una clara reducción de peso molecular, lo que implica una escisión eficiente del N-glicano. Además, el análisis de N-glicano del anticuerpo tratado con Endo S mostró que prácticamente todos los N-glicanos de tipo complejo se habían escindido.

25

Ejemplo 7. Modificación de las unidades GlcNAc(β -N-Asn) en las glicoproteínas

La galactosilación de las unidades GlcNAc(β -N-Asn) en glicoproteínas se lleva a cabo mediante la incubación de la glicoproteína aceptor con la enzima β 1,4-galactosiltransferasa y UDP-galactosa. Por ejemplo, 1 mg de glicoproteína, 30 mM de UDP-Gal, 20 mM de $MnCl_2$ y 3,2 mU/ μ l β 1,4-galactosiltransferasa se mezclan en 100 μ l de tampón apropiado (por ejemplo, tampón MOPS 50 mM, pH 7,0), e incuban durante 24-48 h a +37 °C.

30

Se añade 6-propargilgalactosa a las unidades GlcNAc (β -N-Asn) en glicoproteínas mediante la incubación de la glicoproteína aceptor con la enzima β 1,4-galactosiltransferasa apropiada, por ejemplo galactosiltransferasa de leche bovina (Sigma) o mutante humano galactosiltransferasa 1 (Y285L; R&D Systems) y el donante UDP-PrGal. Por ejemplo, 1 mg de glicoproteína, 30 mM de UDP-PrGal, 20 mM de $MnCl_2$ y 3,2 mU/ μ l de galactosiltransferasa se mezclan en 100 μ l de tampón apropiado (por ejemplo, tampón MOPS 50 mM, pH 7,0) y se incuban durante 24-48 h a +37 °C para la producción de unidades de 6-propargil-Gal β 4GlcNAc (β -N-Asn) en glicoproteínas.

35

Se añade GalNAz a las unidades GlcNAc (β -N-Asn) en glicoproteínas mediante la incubación de la glicoproteína aceptor con la enzima apropiada β 1,4-galactosiltransferasa, por ejemplo, galactosiltransferasa 1 bovina mutante (Y289L; Invitrogen) o galactosiltransferasa humana mutante 1 (Y285L; R&D Systems) y el donante UDP-GalNAz. Por ejemplo, 1 mg de glicoproteína, 30 mM de UDP-GalNAz, 20 mM de $MnCl_2$ y 3,2 mU/ μ l de galactosiltransferasa se mezclan en 100 μ l de tampón apropiado (por ejemplo, tampón MOPS 50 mM, pH 7,0) y se incuban durante 24-48 h a + 37 °C para la producción de unidades de GalNAz β 4GlcNAc (β -N-Asn) en glicoproteínas.

40

45

MODO-TREA-DBCO se preparó como se describe en el Ejemplo 34, y posteriormente se conjugó con unidades GalNAz en GalNAz-trastuzumab (ver arriba) en una reacción click sin cobre de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis Fc después de la conjugación reveló una reacción completa con señal principal a m/z 25695 correspondiente a MODO-TREA-DBCO-GalNAz- β 4 ((Fuc α 6)GlcNAc-trastuzumab).

El ácido azido-N-acetilneuramínico se transfiere a las unidades Gal-NAz β 4GlcNAc (β -N-Asn) en glicoproteínas mediante la incubación de la glicoproteína aceptor con la sialiltransferasa apropiada, por ejemplo ST6Gal1 α 2,6-sialiltransferasa humana recombinante, y el donante CMP-9-desoxi-9-azido-NeuNAc. El aceptor de glicoproteína se puede modificar con las estructuras Gal β 4GlcNAc (β -N-Asn) o Gal-NAz β 4GlcNAc (β -N-Asn) como se describió anteriormente. Por ejemplo, 0,5-10 mg de α -2,6-sialiltransferasa humana ST6Gal1 (R&D Systems), 0,5 mg de aceptor de glicoproteína y 30 mM de CMP-9'-azido-NeuAc se mezclan en 75 μ l de tampón apropiado (por ejemplo,

50

55

Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5), y se incubaron durante 24-48 ha + 37 °C.

Ejemplo 8. Modificación enzimática de cetuximab

5 Cetuximab (Merck Serono) se digirió con 1) α 1,3-galactosidasa (Sigma Aldrich), 2) α 1,3-galactosidasa y Sialidasa A (Glyko) o 3) α 1,3-galactosidasa, Sialidasa A y β 1,4-galactosidasa (Calbiochem). Las reacciones se llevaron a cabo durante la noche a + 37 °C en Na-acetato 50 mM pH 5,5 que contiene 5 mg de cetuximab. Las concentraciones de enzimas en las reacciones fueron 10 mU tampón MOPS 50 mM de α 1,3-galactosidasa, 0,4 mU/ μ l Sialidasa A y 0,19 mU/ μ l β 1,4-galactosidasaa. Después de las reacciones o/n, el progreso de las digestiones se confirmó mediante aislamiento con N-glicano seguido de análisis MALDI-TOF MS: se precipitaron 10-20 mg de anticuerpo con etanol helado 67% (v/v). El precipitado se sedimentó por centrifugación y los N-glicanos se liberaron por incubación o/n con N-glicosidasa F (Glyko). Las mezclas de reacción se purificaron sucesivamente en placas Hypersep C-18 e Hypersep Hypercarb 50 mg de 96 pocillos (Thermo Scientific). Los glicanos neutros y ácidos se eluyeron juntos de Hypercarb con acetonitrilo 25% en ácido trifluoroacético acuoso 0,05%. Los análisis MALDI-TOF MS se llevaron a cabo en modo de ión positivo reflector usando ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB, Aldrich) como matriz.

15 El análisis de MALDI TOF MS de los N-glicanos aislados del cetuximab original reveló las señales mayores para Hex5HexNac2 en m/z 1257, Hex3HexNac4dHex en m/z 1485 y Hex4HexNac4dHex en m/z 1647 correspondiente a los glicanos unidos a N Man5GlcNac2, GlcNac-Man(GlcNacMan)ManGlcNacGlcNac (G0F) y GalGlcNac-Man(GlcNacMan)ManGlc-NacGlcNac (G1F) (Fig. 3). Las señales menores para Hex5HexNac4dHex en m/z 1809, Hex7HexNac4dHex en m/z 2133 y Hex6HexNac4dHexNeuGcNa₂OH en m/z 2300 correspondieron a los glicanos unidos a N GalGlcNacMan(GalGlcNacMan)Man-GlcNacGlcNac (G2F), G2F di- α -1,3-galactosilado y G2F mono- α -1,3-galactosilado que contiene NeuGc.

20 El análisis de MALDI TOF MS de Cetuximab digerido con α 1,3-galactosidasa reveló las señales mayores para Hex5HexNac2 en m/z 1257, Hex3HexNac4dHex en m/z 1485 y Hex4HexNac4dHex en m/z 1647 correspondiente a los glicanos unidos a N Man5GlcNac2, G0F y G1F. Las señales menores para Hex4HexNac4dHexNeuGcNa₂OH en m/z 1976 y Hex5HexNac4dHexNeuGcNa₂OH en m/z 2138 correspondieron a G1F y G2F que contienen NeuGc.

25 El análisis de MALDI TOF MS de cetuximab digeridos con α 1,3-galactosidasa y Sialidasa A reveló las señales mayores para Hex5HexNac2 en m/z 1257, Hex3HexNac4dHex en m/z 1485 y Hex4HexNac4dHex en m/z 1647 correspondiente a glicanos unidos a N Man5GlcNac2, G0F y G1F.

30 El análisis MALDI de cetuximaba digerido con α 1,3-galactosidasa, Sialidasa A y β 1,4-galactosidasa reveló las señales mayores para Hex5HexNac2 en m/z 1257 y Hex3HexNac4dHex en m/z 1485 correspondiente a los glicanos unidos a N Man5GlcNac y G0F.

El análisis MALDI-TOF MS de N-glicano de A) cetuximab, B) cetuximab digerido con α 1,3-galactosidasa, C) cetuximab digerido con α 1,3-galactosidasa y Sialidasa A y D) cetuximab digerido con α 1,3-galactosidasa, Sialidasa A y β 1,4-galactosidasa se muestra en la Fig. 3.

35 Las mezclas de reacción se almacenaron congeladas hasta que se purificaron con columna de proteína G HiTrap (GE Healthcare) usando fosfato de Na 0,02 M pH 7 como tampón de unión y ácido cítrico 0,1 M pH 2,6 como tampón de elución. Las fracciones que contenían IgG se mezclaron y neutralizaron con Na₂HPO₄ 1 M.

Ejemplo 9. β 1,4-Galactosilación de cetuximab modificado

40 Cetuximab tratado con α 1,3-galactosidasa o con α 1,3-galactosidasa y Sialidasa A se galactosiló con β 1,4-galactosiltransferasa (Calbiochem). Las reacciones se llevaron a cabo en 100 μ l de tampón MOPS 50 mM pH 7,0 que contiene 5 mg de cetuximab modificado, 30 mM de UDP-Gal, 20 mM de MnCl₂ y 3,2 mU/ μ l de β 1,4-galactosiltransferasa durante 48 h a +37 °C. La finalización de la reacción se confirmó mediante análisis de N-glicano seguido de análisis MALDI-TOF MS como se describió anteriormente.

Las mezclas de reacción se almacenaron congeladas hasta que se purificaron con la columna HiTrap Proteína G como se describió anteriormente.

45 El análisis de MALDI TOF MS de Cetuximab tratado con β 1,4-galactosiltransferasa digerido con α 1,3-galactosidasa reveló señales mayores para Hex5HexNac2 en m/z 1257 y Hex5HexNac4dHex en m/z 1809, correspondiente a los glicanos unidos a N Man5GlcNac2 y G2F, respectivamente, en consecuencia se confirma la galactosilación exitosa. La señal menor para Hex5HexNac4dHexNeuGcNa₂-H en m/z 2138 correspondió a G2F que contiene NeuGc.

50 El análisis de MALDI TOF MS de cetuximab digerido con α 1,3-galactosidasa y Sialidasa A tratado con β 1,4-galactosiltransferasa reveló las señales mayores para Hex5HexNac2 en m/z 1257 y Hex5HexNac4dHex en m/z 1809 correspondientes a los glicanos unidos a N Man5GlcNac2 y G2F (Fig. 4). Este resultado confirmó la galactosilación exitosa.

Ejemplo 10. α 2,6-Sialilación de cetuximab modificado enzimáticamente con el donante de CMP-9-deoxi-9-azido-NeuNac

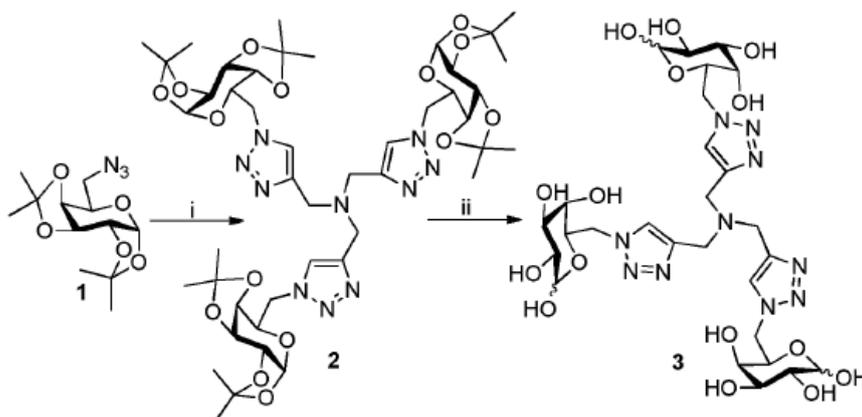
Cetuximab digerido con α 1,3-galactosidasa y Sialidasa A y galactosilado con β 1,4-galactosiltransferasa purificado por proteína G se sometió a sialilación con α 2,6-Sialiltransferasa humana (ST6Gal1, R&D Systems) y CMP-9-deoxi-9-azido-NeuNAc (anteriormente). La reacción se llevó a cabo para 2 x durante la noche a +37 °C en Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM pH 7,5 que contiene 0,5 mg de cetuximab modificado y 30 mM de CMP-9'-azido-NeuAc en 75 μ l de volumen. La reacción se controló por aislamiento de N-glicanos seguido por el análisis de MALDI-TOF MS como se describió anteriormente. Las mezclas de reacción se almacenaron congeladas hasta que se purificaron con la columna HiTrap Proteína G como se describió anteriormente.

El análisis MALDI de cetuximab tratado con ST6Gal1 reveló señales de Hex5HexNac2 en m/z 1257 y Hex5HexNac4dHex en m/z 1809 correspondientes a los glicanos unidos a N Man5GlcNAc2 y G2F, respectivamente, y glicanos sialilados en m/z 2147 y m/z 2485, correspondientes a G2F que lleva una y dos unidades de 9-azido-NeuNAc, respectivamente (Fig. 5). Esta muestra se denominó 9-azido-NeuAc-cetuximab.

Ejemplo 11. Síntesis de TGTA (tris[[1-(6-D-galactosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]amina)

Detalles experimentales generales: los reactivos y disolventes se adquirieron en fuentes comerciales. Los disolventes de reacción se secaron y destilaron antes de su uso cuando fue necesario. Todas las reacciones que contienen reactivos sensibles a la humedad o al aire se llevaron a cabo bajo una atmósfera de argón. La preparación de 1 se ha descrito previamente y se emplearon vías similares en la síntesis actual (véase, por ejemplo, Yang, J., et al., 2003. J. S. Org. Lett. 5: 2223-6).

Los espectros de RMN se registraron con un espectrómetro Bruker Avance que funciona a 600 MHz (1H: 600 MHz, 13C: 150 MHz). Se utilizaron secuencias de pulsos proporcionadas por el fabricante. La temperatura de la sonda durante los experimentos se mantuvo a 22 °C a menos que se mencione lo contrario. Los desplazamientos químicos se expresan en la escala δ (en ppm) utilizando TMS (tetrametilsilano), cloroformo residual, acetona, H₂O o metanol como estándares internos. Las constantes de acoplamiento se dan en Hz y se proporcionan solo una vez cuando se encuentran por primera vez. Los patrones de acoplamiento se dan como s, singulete, d, doblete, t, triplete, etc. Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrómetro de masas Bruker Ultraflex III MALDI-TOF operado en modo positivo/negativo. La TLC se realizó en láminas de aluminio revestidas previamente con gel de sílice 60 F254 (Merck). La cromatografía flash se realizó sobre gel de sílice 60 (0,040-0,060 mm, Aldrich). Las manchas se visualizaron por UV seguido de carbonización con H₂SO₄/MeOH y calentamiento.



Esquema 5. i) Tripropargilamina, CuSO₄, L-ascorbato de sodio, DMF:H₂O 3:1, RT, 40h, cuantitativo; ii) 60% TFA (en H₂O), 60°C, 2.5h, cuantitativo.

TGTA protegido (2): A una solución que contiene 43 mg de 1 (0,15 mmol, 5 equiv.) y 4,3 ml tripropargilamina (0,03 mmol, 1 equiv.) en 2 ml de DMF:H₂O (3:1) se añadieron 2,4 mg de CuSO₄ (0,015 mmol, 0,5 equiv.) y 6,4 mg de L-ascorbato de sodio (0,03 mmol, 1 equiv.). La mezcla resultante se agitó a RT durante 40 h (durante este tiempo un sólido blanco precipitó de la mezcla de reacción). Después de 40 h, la mezcla de reacción se diluyó con 20 ml de EtOAc, se transfirió a un embudo de separación y se lavó con 5 ml de solución NH₄Cl (preparada por disolución de una solución saturada de NH₄Cl con cantidad igual de agua 1:1 v/v) y 15 ml de salmuera. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró para proporcionar el producto bruto.

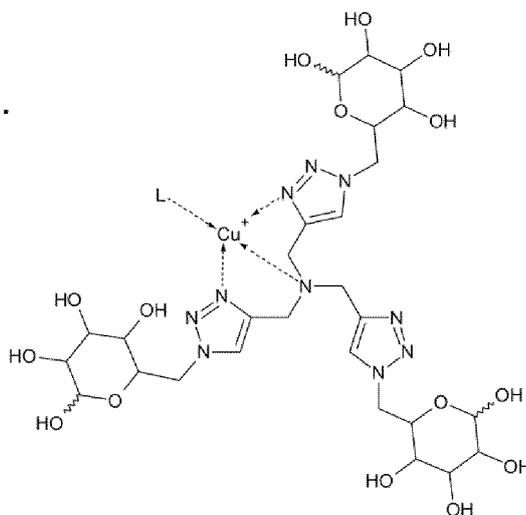
El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc→EtOAc:MeOH 3:1) para proporcionar 2 como un

aceite incoloro (30 mg, cuantitativo). TLC: $R_f = 0,22$ (EtOAc). ^1H RMN (600MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 8,56$ (s, 3 H, triazol-*H*), 5,48 (d, 3 H, $J_{1,2} = 5,0\text{Hz}$, H-1), 4,67 (dd, 3 H, $J_{6a,5} = 3,1$, $J_{6a,6b} = 14,1\text{Hz}$, H-6a), 4,65 (dd, 3 H, $J_{3,2} = 2,5$, $J_{3,4} = 8,1$, H-3), 4,58 (dd, 3 H, $J_{6b,5} = 9,0\text{Hz}$, H-6b), 4,41 y 4,33 (cada d, cada 3 H. $J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{NCH}_2\text{b}} = 14,1\text{Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2)_3$), 4,32 (dd, 3 H, H-2), 4,25 (dd, H, $J_{4,5} = 1,4\text{Hz}$, H-4), 4,17 (ddd, 3 H, H-5), 1,50, 1,39, 1,37 y 1,25 (cada s, cada 9 H, $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm. HRMS: calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{66}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1009,46; experimental 1009,40.

TGTA (3) : 33 mg de 2 (0,034 mmol) se disolvieron en 3 ml de TFA 60% (en H_2O) y se agitaron a 50 °C durante 1,5 horas. La mezcla de reacción posteriormente se diluyó con agua, se concentró y se secó bajo vacío para proporcionar 3 como un sólido blanco (25 mg, cuantitativo, $\alpha:\beta$ 2:3). Datos de RMN seleccionados; ^1H RMN (600MHz, D_2O , 25 °C): $\delta = 8,32$ (s, 6 H (α y β , 3 H cada), triazol-*H*), 5,21 (d, 3 H, $J_{1,2} = 3,9\text{Hz}$, H-1 α), 4,59 (s, 12 H (α y β , 6 H cada), $\text{N}(\text{CH}_2)_3$), 4,50 (d, 3 H, $J_{1,2} = 8,1\text{Hz}$, H-1 β).

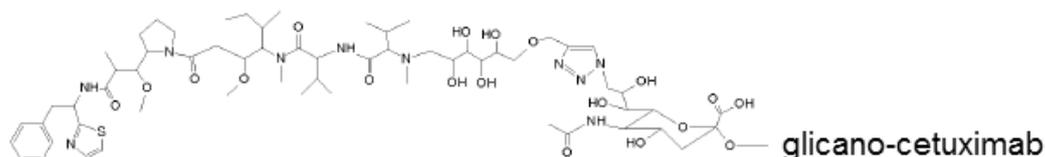
HRMS: calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 769,27; experimental 769,23.

La estructura del TGTA y su modo propuesto de quelación con cobre (I):



Ejemplo 12. Conjugación de 9-azido-NeuAc-cetuximab con N-(6-propargil-D-galactosa)-monometildolastatina 10

N-(6-propargil-D-galactosa)-monometildolastatina 10 (MODO-Gal) se conjugó con N-glicanos 9-azido-NeuAc-cetuximab por medio de ácidos siálicos modificados con 9-azido. La reacción se llevó a cabo durante 3,5 horas a RT en PBD diluido que contiene 75 μg de 9-azido-NeuAc-cetuximab (above), 13 nmol MODO-Gal, 25 nmol de TGTA, 25 nmol de ascorbato Na y 5 nmol de CuSO_4 . El producto de reacción se purificó en un concentrador Amicon Ultracel 30 K (Millipore) en varias adiciones de PBS y posteriores centrifugaciones. La reducción de SDS-PAGE del producto de reacción reveló cadenas livianas de IgG (≈ 30 kDa) y pesadas (≈ 55 kDa). No se pudo detectar productos de escisión de proteínas.



Esquema 6: Estructura del conjugado de anticuerpo-fármaco de cetuximab y dolastatina 10

Ejemplo 13. Producción de glicofomas del anticuerpo monoclonal en las células CHO

El trastuzumab se produjo de manera transitoria con el Sistema de expresión Max FreeStyle™ (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de aminoácidos de trastuzumab estaban de acuerdo con la base de datos IMGT (<http://www.imgt.org>) para las secuencias de cadena liviana (7637_L) y cadena pesada

(7367_H). Las secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican las secuencias de la cadena pesada y liviana se adquirieron en GeneArt (Life Technologies) y se clonaron por separado en vectores de expresión pCEP4 (Life Technologies). Para la expresión de anticuerpos, las células CHO-S FreeStyle™ se transfectaron 1: 1 con vectores de cadena liviana y cadena pesada.

5 El análisis de N-glicano se realizó en los anticuerpos de Trastuzumab producidos como se describió anteriormente. El análisis reveló el siguiente perfil de N-glicanos: 1,2% de Hex3HexNAc3, 9,6% de Hex5HexNAc2 (Man5), 2,2% de Hex3HexNAc3dHex, 2,5% de Hex3HexNAc4 (G0), 3,3% de Hex6HexNAc2, 56,7% de Hex3HexNAc4dHex (G0F), 1,8% de Hex4HexNAc4 (G1), 1,6% de Hex7HexNAc2, 7,4% de Hex4HexNAc4dHex (G1F), 1,1% de Hex5HexNAc4 (G2), 5,6% de Hex3HexNAc5dHex, 1,5% de Hex8HexNAc2, 1,9% de Hex5HexNAc4dHex (G2F) y 1,2% de Hex9HexNAc2. En consecuencia los tipos de N-glicano más importantes fueron G0(F) (59%), G1(F) (9%) y Man5 (10%).

15 El kit Freedom CHO-S (Life Technologies) se utilizó para el desarrollo de líneas celulares estables que producen cetuximab. El trabajo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de aminoácidos de cetuximab estaban de acuerdo con la base de datos IMGT (<http://www.imgt.org>) para las secuencias de cadena liviana y cadena pesada. Las secuencias de nucleótidos optimizadas que codifican las secuencias de la cadena pesada y liviana se adquirieron de GeneArt (Life Technologies) y se clonaron por separado en vectores de expresión pCEP4 (Life Technologies). Para una expresión estable, las células CHO-S FreeStyle™ se transfectaron con vectores de cadena liviana y cadena pesada 1: 1 linealizados. Los transfectantes se seleccionaron con puromicina y metotrexato, después de lo cual se realizó el aislamiento del clon mediante clonación de dilución limitada. Las líneas celulares clonadas se aumentaron de escala y se evaluó la productividad.

20 Se realizó un análisis de glicano a los anticuerpos de cetuximab producidos como se describió anteriormente. El análisis de un clon de células productoras de anticuerpos seleccionado reveló el siguiente perfil de N-glicano: 11,7% de Hex3HexNAc3, 5,7% de Hex5HexNAc2, 4,8% de Hex3HexNAc3dHex, 2,8% de Hex3HexNAc4 (G0), 1,6% de Hex6HexNAc2, 75,3% de Hex3HexNAc4dHex (G0F), 4,3% de Hex4HexNAc4dHex (G1F) y 2,8% de Hex3HexNAc5dHex. Por lo tanto, los N-glicanos eran principalmente de tipo G0 (F) (> 78%) con solo proporciones menores de glicanos con alto contenido de manosa (Hex5HexNAc2, Hex6HexNAc2), galactosilados (G1F) o afucosilados (G0). Otros clones celulares analizados también fueron de manera similar principalmente del tipo G0 (F). El análisis de las cadenas pesadas de Fab aisladas mostró que los sitios de N-glicosilación de dominio variable de los anticuerpos de cetuximab producidos estaban glicosilados. En consecuencia, las líneas celulares generadas tenían un nivel de galactosilación inesperadamente bajo y una alta proporción de residuos de GlcNAc accesibles también en los N-glicanos de dominio variable.

Ejemplo 14. Citotoxicidad *in vitro* de conjugados de anticuerpo

35 La línea celular de cáncer de ovario humano SKOV-3 y la línea celular de cáncer de cabeza y cuello HSC-2 eran del ATCC (Manassas, Virginia, USA). Las células se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se recogieron cultivos en fase logarítmica y se sembraron 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Se prepararon diluciones seriadas de las moléculas de prueba en medio de cultivo celular, se añadieron a las células y los cultivos se incubaron adicionalmente durante 96 h. La viabilidad celular se evaluó utilizando el reactivo de viabilidad celular PrestoBlue (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 2 h, y la reducción de colorante se midió por absorbancia a 570 nm. Los compuestos se analizaron 1-2 veces por triplicado.

45 Los resultados se expresan como valores de IC50 de los derivados analizados como el intervalo de concentración en equivalentes de dolastatina en que la viabilidad de las células cancerosas cae al 50%. El conjugado de triazol de 9-azido-NeuAc-cetuximab y N-(6-O-propargil-D-galactosil)-monometildolastatina 10 fue citotóxico para ambas líneas celulares SKOV-3 y HSC-2 con IC50 a 1 nM o menos, mientras que el derivado no conjugado N-(6-O-propargil-D-galactosil)-monometildolastatina 10 fue al menos 100 veces menos tóxico para las células que el anticuerpo conjugado en los mismos experimentos.

Ejemplo 15. Ensayos de estabilidad de los conjugados de sacárido

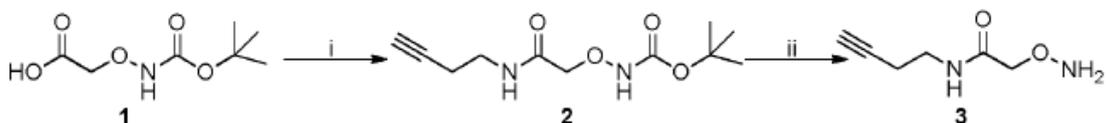
50 La estabilidad del conjugado de sacárido se evalúa mediante incubación a +37 °C durante períodos de tiempo variables de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana en suero humano o animal preparado mediante la incubación de sangre a temperatura ambiente y centrifugación para separar el coágulo, o incubación de manera similar en plasma humano o animal preparado por recolección de sangre fresca en tubos heparinizados. El conjugado se aísla y analiza como se describe anteriormente para detectar la proporción de conjugado intacto.

Ejemplo 16. Ensayos de hidrólisis de conjugados de sacáridos

55 La tasa de hidrólisis del conjugado de sacárido se evalúa mediante incubación a +37 °C durante períodos de tiempo variables de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 día en presencia de una fuente de enzima a pH ácido, preferiblemente a pH 4,5. La fuente de enzima es por ejemplo peptidasa recombinante o enzima glucosidasa como la β -galactosidasa o β -hexosaminidasa lisosómica humana disponible en R&D Systems, o un lisado de células humanas o animales como fuente de todas las enzimas lisosómicas, o la membrana de glóbulos

rojos humanos se prepara como fuente de sialidasa lisosómica. El conjugado se aísla y analiza como se describe anteriormente para detectar la proporción de conjugado intacto.

Ejemplo 17. Síntesis del ligador aminooxi



Esquema 7.

Síntesis de compuestos **2** y **3**: i)

N-metilmorfolina (NMM), isobutilcloroformiato (IBCF), 1-amino-

3-butino, tetrahidrofurano (THF), RT, 1.5 h ; ii) DCM:TFA (1:1), RT, 1 h.

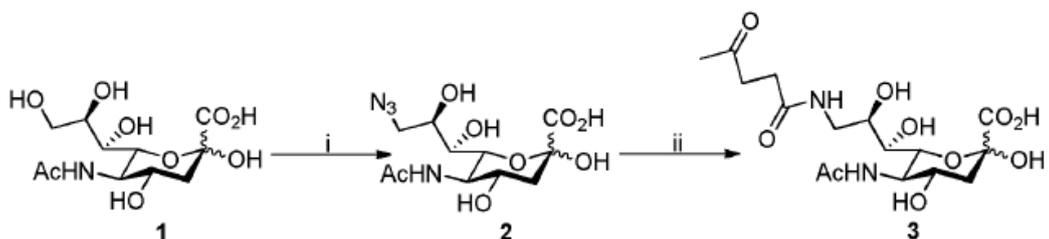
5 2-[N-(terc-butoxicarbonil)aminooxi]-N-(butinil)acetamida (2)

0,41 g (2,1 mmol) de **1** se disolvieron en 7 ml de THF seco (bajo atmósfera de argón) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Se añadieron 0,24 ml (2,1 mmol, 1 equiv.) de NMM y 0,28 ml (2,1 mmol, 1 equiv.) de IBCF y la mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h a 0 °C. Se añadieron 0,18 ml (2,1 mmol, 1 equiv.) de 1-amino-3-butino y la mezcla resultante se llevó a RT y se agitó durante 1,5 h adicionales. La mezcla posteriormente se filtró y concentró y el producto bruto se disolvió en 20 ml de Et₂O y se lavó con 10 ml de NaOH 0,1 M, 10 ml de HCl 1 M y 10 ml de salmuera. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (hexano:EtOAc 1:2) para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco. TLC: *R_f* = 0,34 (en hexano:EtOAc 1:2). ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃, 22 °C) : δ 8,25 (br s, 1 H, NH), 7,48 (s, 1 H, NH), 4,33 (s, 2 H, OCH₂CO), 3,49 (ap q, 2 H, *J* = 6,8 Hz, HCH₂CH₂C≡CH), 2,44 (ap td, 2 H, *J* = 2,6, 6,8 Hz, NHCH₂CH₂C≡CH), 1,99 (ap t, 1 H, *J* = 2,6 Hz, NHCH₂CH₂C≡CH) y 1,49 (s, 9 H, OC(CH₃)₃) ppm.

15 2-[N-aminooxi]-N-(butinil) acetamida (3)

0,13 g (0,5 mmol) de **2** se disolvieron en 2 ml de DCM, se enfrió en un baño de hielo y 2 ml de TFA se añadieron lentamente a la mezcla. La mezcla se agitó durante 1 h a RT (control de TLC) y se concentró para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro. ¹H RMN (600 MHz, D₂O, 22 °C) : δ 4,62 (s, 2 H, OCH₂CO), 3,40 (ap t, 2 H, *J* = 6,7 Hz, NHCH₂CH₂C≡CH), 2,43 (ap td, 2 H, *J* = 2,6, 6,7 Hz, NHCH₂CH₂C≡CH) y 2,34 (ap t, 1 H, *J* = 2,6 Hz, NHCH₂CH₂C≡CH) ppm.

Ejemplo 18. Síntesis de NeuNAc 9-modificado



Esquema 8. Síntesis del compuesto **3**: i) 1) MeOH, AG 50W-

X8 (forma H⁺), 45 °C, o/n; 2) TsCl, piridina, 0 °C → RT, o/n; 3) NaN₃, Acetona:H₂O (3:1), 75 °C, o/n; ii) 1) Pd/C, H₂ (40 psi), H₂O:AcOH, o/n; 2) Éster NHS del ácido levulínico, NaHCO₃, dioxano:H₂O (4:3), RT, o/n.

Éster NHS del ácido levulínico

25 0,3 ml (2,93 mmol) de ácido levulínico se disolvieron en 7 ml de DMF seco (bajo atmósfera de argón) y se añadieron 0,84 g (4,4 mmol, 1,5 equiv.) de EDC3HCl y 0,41 g (3,5 mmol, 1,2 equiv.) de NHS. La mezcla resultante se agitó o/n

a RT, posteriormente se diluyó con 20 ml de EtOAc y se lavó con 20 ml de una solución saturada de cloruro de amonio, 20 ml de H₂O y 20 ml de salmuera. La fase orgánica se separó y se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró para proporcionar el producto bruto como un polvo blanco (0,45 g, 71 %). El producto bruto se utilizó como tal en la siguiente etapa.

5 Ácido 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico (2)

A una solución que contiene 63 mg de 1 (0,2 mmol) en 5 ml de MeOH seco (bajo argón) se añadieron 127 mg de AG 50W38 (Forma H⁺, 2 equiv en peso) y la mezcla resultante se agitó a 45 °C o/n. La mezcla posteriormente se filtró y concentró para proporcionar neuraminato de metil N-acetilo como un sólido blanco (65 mg, cuantitativo). TLC: *R_f* = 0,43 (DCM:MeOH 3:1).

- 10 157 mg de neuraminato de metil N-acetilo (0,49 mmol) se disolvieron en 5 ml de piridina seca (bajo argón) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadieron 135 mg de TsCl (0,7 mmol, 1,4 equiv.) y la mezcla de reacción se calentó lentamente a RT y se dejó agitar o/n. Después de 23 horas se añadieron 134 mg de TsCl (0,7 mmol, 1,4 equiv.) a la mezcla de reacción y se agitó durante 2 horas adicionales a RT. La mezcla posteriormente se enfrió a 0 °C y la reacción se inactivó con MeOH. La mezcla se concentró y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna (MeOH:DCM 1:9) para proporcionar metilo 9-O-tosil-N-acetil-neuraminato como un aceite amarillento (159 mg, 67%). TLC: *R_f* = 0,29 (DCM:MeOH 9:1).

Datos de RMN seleccionados; ¹H RMN (600MHz, CD₃OD, 22 °C): δ 7,80-7,43 (m, 4 H, CH₃C₆H₄SO₂), 4,28 (dd, 1 H, *J* = 2,2, 10,1 Hz), 4,06-3,99 (m, 2 H), 3,93 (dd, 1 H, *J* = 1,5, 10,6 Hz), 3,85 (ddd, 1 H, *J* = 2,0, 5,7, 8,5 Hz), 3,77 (s, 3 H, CO₂CH₃), 3,43 (dd, 1 H, *J* = 1,5, 9,0 Hz), 2,46 (s, 3 H, CH₃C₆H₄SO₂), 2,19 (dd, 1 H, *J* = 4,9, 12,9 Hz, H-3eq), 2,00 (s, 3 H, NHCOCH₃) y 1,86 (dd, 1 H, *J* = 11,5, 12,9 Hz, H-3ax) ppm. HRMS: calculado para C₁₉H₂₇O₁₁NNaS [M+Na]⁺ 500,12; experimental 500,20.

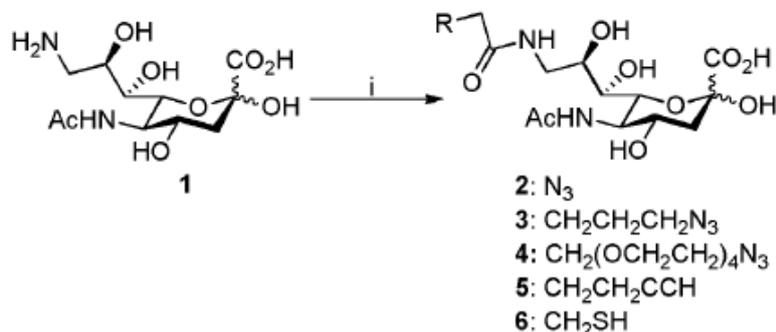
- 25 110 mg de 9-O-tosil-N-acetil-neuraminato de metilo (0,23 mmol) se disolvieron en 2 ml de acetona:H₂O (3:1) y se añadieron 70 mg de NaN₃ (1,1 mmol, 4,3 equiv.). La mezcla resultante se calentó a 75 °C y se agitó o/n. La mezcla de reacción posteriormente se concentró y el producto bruto se purificó por cromatografía de filtración en gel para proporcionar 2 como una espuma amarillenta (40 mg, 52%). Datos de RMN seleccionados; ¹H RMN (600MHz, D₂O, 22 °C): δ 4,03 (ddd, 1 H, *J* = 5,1, 10,1, 10,3 Hz), 3,99 (dd, 1 H, *J* = 0,9, 10,6 Hz), 3,94-3,89 (m, 2 H), 3,61 (dd, 1 H, *J* = 2,8, 13,1 Hz), 3,53 (ap d, 1 H, *J* = 9,4 Hz), 3,49 (dd, 1H, *J* = 6,0, 13,1 Hz), 2,22 (dd, 1 H, *J* = 4,9, 12,9 Hz, H-3eq), 2,07 (s, 3 H, NHCOCH₃) y 1,83 (dd, 1 H, *J* = 11,7, 12,9 Hz, H-3ax) ppm. HRMS: calculado para C₁₁H₁₈O₈N₄Na [M+Na]⁺ 357,10; experimental 357,12; calculado para C₁₁H₁₇O₈N₄Na₂ [M+2Na-H]⁺ 379,08; experimental 379,10.

30 Ácido 5-acetamido-3,5,9-trideoxi-9-[(1,4-dioxopentil)amino]-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico (3)

26 mg (0,08 mmol) de 2 se disolvieron en 2,5 ml de H₂O y el pH se ajustó a 1/3 con AcOH. Se añadieron 7,9 mg (0,3 equiv peso) de Pd/C (10 % Pd) y la mezcla resultante se colocó dentro un reactor de hidrogenación. La presión de hidrógeno se ajustó a 40 psi (~ 2,7 bar) y la mezcla se agitó o/n, posteriormente se filtró a través de celite y se concentró para proporcionar el producto bruto ácido 5-acetamido-3,5,9-trideoxi-9-amino-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico como un aceite amarillento. Este producto se utilizó como tal en la siguiente etapa.

- 35 22 mg (0,07 mmol) de ácido 5-acetamido-3,5,9-trideoxi-9-amino-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico se disolvió en 3 ml de H₂O y el pH se ajustó a 8/9 con una solución saturada de NaHCO₃. 23 mg (0,11 mmol, 1,5 equiv.) de éster NHS de ácido levulínico se disolvieron en 4 ml de dioxano y se añadieron lentamente a la solución que contiene el ácido siálico en H₂O. La mezcla de reacción posteriormente se agitó a RT o/n en la oscuridad y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía de filtración en gel para proporcionar el compuesto del título. HRMS: calculado para C₁₆H²⁶O₁₀N₂Na [M+Na]⁺ 429,15; experimental 429,19; calculado para C₁₆H₂₅O₁₀N₂Na₂ [M+2Na-H]⁺ 451,13; experimental 451,17.

Síntesis de otros análogos NeuNAc 9-modificados



Esquema 9. Síntesis del compuesto 2-6: i) correspondiente éster NHS, NaHCO₃, dioxano:H₂O (4:3), RT, o/n.

Procedimiento general para la síntesis de los ésteres HHS de ácido carboxílico

El correspondiente ácido carboxílico se disolvió en 2 ml de DMF seco/mmol de ácido (bajo atmósfera de argón) y se añadieron 1,5 equiv. de EDCxHCl y 1,2 equiv de NHS. La mezcla resultante se agitó o/n t RT, posteriormente se diluyó con 7 ml de EtOAc/mmol de ácido y se lavó con 7 ml de una solución saturada de cloruro de amonio/mmol de ácido, 7 ml H₂O/mmol de ácido y 7 ml salmuera/mmol de ácido. La fase orgánica se separó y se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se utilizó como tal en la siguiente etapa.

Procedimiento general para la síntesis de NeuNAc modificado con 9-amido

El ácido 5-acetamido-3,5,9-trideoxi-9-amino-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico se disolvió en 2 ml de H₂O/30 mg de 1 y el pH se ajustó a 8/9 con una solución saturada de NaHCO₃. 1,5 equiv. del correspondiente éster NHS de ácido carboxílico se disolvieron en 2 ml de dioxano/30 mg de Éster NHS y se añadieron lentamente a la solución que contiene el ácido siálico en H₂O. La mezcla de reacción posteriormente se agitó a RT o/n en la oscuridad y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía de filtración en gel para proporcionar el correspondiente 9-amido NeuNAc.

15 Éster NHS del ácido hexinoico

La síntesis comenzó de acuerdo con el procedimiento general para síntesis de éster NHS de ácido carboxílicos para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillento en rendimiento cuantitativo.

Éster NHS del ácido 5-azidopentanoico

La síntesis comenzó de acuerdo con el procedimiento general para síntesis de éster NHS de ácido carboxílicos para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro en rendimiento cuantitativo.

Compuesto 2

La síntesis comenzó de acuerdo con el procedimiento general para síntesis de NeuNAc modificado con 9-amido. HRMS: calculado para C₁₃H₂₁O₉N₅Na [M+Na]⁺ 414,12; experimental 413,97; calculado para C₁₃H₂₀O₉N₅Na₂ [M+2Na-H]⁺ 436,11; experimental 435,97. RMN de acuerdo con los datos publicados por J. C. Paulson et. al. en Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 11014.

Compuesto 3

La síntesis comenzó de acuerdo con el procedimiento general para síntesis de NeuNAc modificado con 9-amido. Datos de RMN seleccionados: ¹H RMN (600MHz, D₂O, 22 °C): δ 3,56 (dd, 1 H, J = 3,0, 14,1 Hz), 3,40 (dd, 1 H, J = 1,0, 9,0 Hz), 3,25 (dd, 1 H, J = 7,8, 14,1 Hz), 2,03 (s, 3 H, NHCOCH₃) y 1,68-1,55 (m, 4 H, NHCOCH₂CH₂CH₂CH₂N₃) ppm. HRMS: calculado para C₁₆H₂₇O₉N₅Na [M+Na]⁺ 456,17; experimental 456,21; calculado para C₁₆H₂₆O₉N₅Na₂ [M+2Na-H]⁺ 478,15; experimental 478,17.

Compuesto 4

La síntesis comenzó de acuerdo con el procedimiento general para síntesis de NeuNAc modificado con 9-amido. HRMS: calculado para C₂₂H₃₉O₁₃N₅Na [M+Na]⁺ 604,22; experimental 604,23; calculado para C₂₂H₃₈O₁₃N₅Na₂ [M+2Na-H]⁺ 626,23; experimental 626,21.

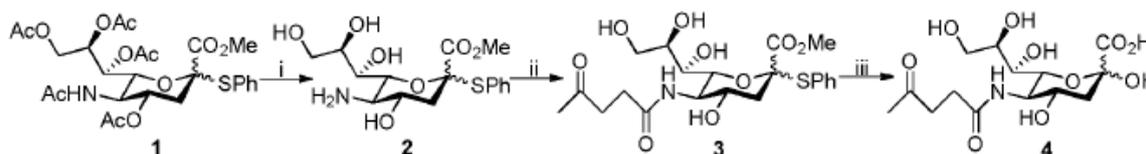
Compuesto 5

La síntesis comenzó de acuerdo con el procedimiento general para síntesis de NeuNAc modificado con 9-amido. Datos de RMN seleccionados; ^1H RMN (600MHz, D_2O , 22 °C): δ 3,55 (dd, 1 H, $J = 2,9, 14,2$ Hz), 3,40 (dd, 1 H, $J = 1,0, 9,1$ Hz), 3,27 (dd, 1 H, $J = 7,6, 14,2$ Hz), 2,03 (s, 3 H, NHCOCH_3) y 1,83-1,76 (m, 2 H) ppm. HRMS: calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 425,15; experimental 425,11; calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}_2\text{Na}_2$ $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ 447,14; experimental 447,10.

Compuesto 6

La síntesis comenzó de acuerdo con el procedimiento general para síntesis de NeuNAc modificado con 9-amido a partir de 1 y SPDP (el grupo protector de piridilditiol se escinde parcialmente en las condiciones de reacción para proporcionar 6). HRMS: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 419,11; experimental 419,16; calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}_2\text{SNa}_2$ $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ 441,09; experimental 441,13.

Ejemplo 19. Síntesis de NeuNAc 5-modificado



Esquema 10. Síntesis del compuesto 4: i) MeSO_3H , MeOH , 60

°C, o/n; ii) Éster NHS del ácido levulínico, NaHCO_3 , dioxano: H_2O (4:3), RT, o/n; iii) 1) NBS , Acetona: H_2O (9:1), 0 °C \rightarrow RT, 2 h; 2) NaOMe , $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, RT, o/n.

15

Metil éster del ácido fenil 5-amino-2-tio-D-neuramínico (2)

96,3 mg (0,17 mmol) de 1 se disolvieron en 7 ml de MeOH seco (bajo atmósfera de argón) y se añadieron 0,45 ml de MeSO_3H . La mezcla resultante se agitó a 60 °C o/n y se concentró para proporcionar el producto bruto. Este producto se utilizó como tal en la siguiente etapa. Datos analíticos seleccionados; HRMS: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{NS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 374,13; experimental 374,15; calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{NSNa}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 396,11; experimental 396,13.

20

Metil éster del ácido fenil 5-[(1,4-dioxopentil)amino]-2-tio-D-neuramínico (3)

El producto bruto de la etapa previa (63 mg, 0,17 mmol) se disolvieron en 3 ml de H_2O y el pH se ajustó a 8/9 con una solución saturada de NaHCO_3 . 0,1 g (0,51 mmol, 3 equiv.) del éster NHS de ácido levulínico disuelto en 4 ml de dioxano se añadió lentamente a la mezcla de reacción. La mezcla resultante se agitó o/n a RT en la oscuridad y posteriormente se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna ($\text{MeOH}:\text{DCM}$ 1:5 \rightarrow 1:3) para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (80 mg, cuant.). TLC: $R_f = 0,43$ ($\text{DCM}:\text{MeOH}$ 5:1). Datos de RMN seleccionados; ^1H RMN (600MHz, CD_3OD , 22 °C): δ 7,62-7,32 (m, 5 H, arom. H), 4,53 (dd, 1 H, $J = 0,7, 10,6$ Hz), 4,13 (m, 1 H, H-4), 3,87 (t, 1 H, $J = 10,2$ Hz), 3,82 (dd, 1 H, $J = 2,9, 11,3$ Hz), 3,78 (m, 1 H), 3,67 (dd, 1 H, $J = 5,5, 11,3$ Hz), 3,57 (d, 1 H, 9,4 Hz), 3,50 (s, 3 H, CO_2CH_3) y 2,19 (s, 3 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$) ppm.

25

HRMS: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_9\text{NSNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 494,15; experimental 494,16.

30

5-[(1,4-dioxopentil)amino]-D-ácido neuramínico (4)

80 mg (0,17 mmol) de 3 se disolvieron en 5 ml de acetona: H_2O (9:1) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadieron 127 mg (0,72 mmol, 4,2 equiv.) de NBS y la mezcla resultante se agitó durante 2 h (0 °C \rightarrow RT; control por TLC) y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna ($\text{MeOH}:\text{DCM}$ 1:5 \rightarrow $\text{MeOH}:\text{EtOAc}$ 1:3) para proporcionar 5-[(1,4-dioxopentil)amino]-D-ácido neuramínico metilo ester como un aceite incoloro (36 mg, 56 %). TLC: $R_f = 0,17$ ($\text{DCM}:\text{MeOH}$ 5:1). HRMS: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_{10}\text{NNA}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 402,14; experimental 402,16.

35

36 mg (0,096 mmol) de metil éster de ácido 5-[(1,4-dioxopentil)amino]-D-neuramínico se disolvieron en 4 ml de MeOH seco (bajo atmósfera de argón) y 70 μl de una solución 5 M de NaOMe en MeOH . Se añadieron algunas gotas de H_2O y la mezcla resultante se dejó agitar o/n a RT. La mezcla de reacción posteriormente se neutralizó con AG 50W38 (Forma H^+), se filtró y concentró para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó por

40

cromatografía de filtración en gel para proporcionar el compuesto del título. HRMS: calculado para $C_{14}H_{23}O_{10}NNa$ $[M+Na]^+$ 388,12; experimental 388,17; calculado para $C_{14}H_{22}O_{10}NNa_2$ $[M+2Na-H]^+$ 410,10; experimental 410,15.

Ejemplo 20. Generación de unidades de Fuca1-6GlcNAc(β -N-Asn) en cetuximab

5 Los N-glicanos complejos del dominio Fc del anticuerpo cetuximab se truncaron en unidades Fuca1-6GlcNAc por digestión con endo- β -N-acetilglucosaminidasa S (Endo S) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (IgGZERO, Genovis). En resumen, se incubaron 13 mg de anticuerpo con 1500 U de Endo S en 1375 μ l de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, a 37 °C durante la noche. El análisis Fc del anticuerpo tratado con Endo S mostró que todos los N-glicanos de tipo complejo se habían escindido (Figura 6). La enzima del fabricante utilizada en el análisis Fc escindió algunos de los residuos de lisina en el sitio de escisión. En consecuencia, las señales m/z 10 24132 y 24262 corresponden a Fuca1-6GlcNAc-Fc sin lisina y Fuca1-6GlcNAc-Fc con lisina. No se observaron signos de escisión de N-glicano de la región Fab de la cadena pesada.

La mezcla de reacción se purificó con la columna HiTrap Proteína G (GE Healthcare) usando fosfato de Na 0,02 M pH 7 como el tampón de unión y ácido cítrico 0,1 M pH 2,6 como el tampón de elución. Las fracciones que contienen IgG se mezclaron y neutralizaron con Na_2HPO_4 1 M.

15 La Figura 6 muestra MALDI-TOF de N-glicanos de la región Fc de cetuximab digeridos con Endo S.

Ejemplo 21. Galactosilación y sialilación de unidades de GlcNAc(β -N-Asn) en cetuximab tratado con Endo S

La galactosilación de las unidades de Fuca1-6GlcNAc(β -N-Asn) en cetuximab se llevó a cabo mediante la incubación del anticuerpo con la enzima β 1,4-galactosiltransferasa y UDP-galactosa. 12 mg de anticuerpo, 30 mM de UDP-Gal, 20 mM de $MnCl_2$ y 3,2 mU/ μ l de β 1,4-galactosiltransferasa se mezclaron en 400 ml de tampón MOPS 20 50 mM, pH 7,2, y se incubaron durante 24 h a +37 °C. La muestra se llevó al análisis Fc. Después de ello se añadieron enzima α -2,6-Sialiltransferasa y CMP-NeuNAc a la mezcla de reacción a concentraciones finales de 0,03 mg/ml y 30 mM, respectivamente, y la incubación continuó 3 días.

El análisis Fc de la muestra tratada con β 1,4-galactosiltransferasa reveló la galactosilación completa de N-acetilglucosaminas (Figura 7). Las señales de m/z 24302 y 24431 corresponden a Gal β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Fc sin lisina y Gal β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Fc con lisina.

El análisis Fc de la muestra tratada con β 1,4-galactosiltransferasa y α -2,6-sialiltransferasa reveló las señales mayores en m/z 24298,24591 y 24720 correspondiente a Gal β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Fc sin lisina, NeuNAc α -2,6Gal β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Fc sin lisina y NeuNAc α -2,6Gal β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Fc con lisina (Figure 8). Se sialilaron aproximadamente el 65% de las galactosas.

30 La Figura 7 muestra el MALDI-TOF de los Fc-glicanos tratados con Endo S β 1-4-galactosilados.

La Figura 8 muestra el MALDI-TOF de Fc-glicanos tratados con Endo S β -1,4-galactosilados y α -2,6-sialilados.

La mezcla de reacción se purificó con la columna HiTrap Proteína G (GE Healthcare) usando fosfato de Na 0,02 M pH 7 como el tampón de unión y ácido cítrico 0,1 M pH 2,6 como el tampón de elución. Las fracciones que contienen IgG se mezclaron y se neutralizaron con Na_2HPO_4 1 M.

35 Ejemplo 22. Galactosilación y sialilación de cetuximab

La galactosilación de GlcNAc terminal en los N-glicanos complejos de cetuximab se llevó a cabo mediante la incubación del anticuerpo con la enzima β -1,4-galactosiltransferasa y UDP-galactosa. 13 mg de anticuerpo, 30 mM de UDP-Gal, 20 mM de $MnCl_2$ y 2,5 mU/ μ l de β 1,4-galactosiltransferasa se mezclaron en 400 ml de tampón MOPS 40 50 mM, pH 7,2, y se incubó durante 48 h a +37 °C. Después de ello la enzima α -2,6-Sialiltransferasa y CMP-NeuNAc se añadieron a concentraciones finales de 0,03 mg/ml y 30 mM, respectivamente, y la incubación continuó 4 días.

El análisis Fc de cetuximab antes de la galactosilación y sialilación reveló la mayor señal en m/z 25230 correspondiente a G0F-Fc. El análisis Fc de la muestra tratada con β 1,4-galactosiltransferasa y α -2,6-sialiltransferasa reveló las señales mayores en m/z 25555 y 25847 correspondientes a G2F-Fc y G2F-Fc mono-sialilado, respectivamente (Figura 9B). La ausencia de señal de G0F-Fc en m/z 25230 reveló la galactosilación completa en la reacción de β -1,4-galactosiltransferasa.

Ejemplo 23. Oxidación ácidos siálicos en cetuximab galactosilado y sialilado (tratado con Endo S/no tratado con Endo S)

Los ácidos siálicos en los N-glicanos de las muestras de cetuximab galactosilado y sialilado se oxidaron selectivamente con peryodato. 5-10 mg de anticuerpo se mezclaron con meta-peryodato de sodio 1 mM en 1 ml de tampón acetato de Na 0,1 M pH 5,5 y se incubaron 0,5 h RT en la oscuridad. El meta-peryodato de sodio sin reaccionar se eliminó mediante adiciones repetidas de PBS y centrifugaciones en una unidad de filtro centrífugo Amicon Ultracel 30 K 0,5 ml (Millipore).

El análisis Fc del cetuximab tratado con Endo S, galactosilado, sialilado y oxidado reveló las señales mayores en m/z 24333, 24463, 24565 y 24688 correspondiente a Gal β 1-4(Fuca α 1-6)GlcNAc-Fc sin lisina y con lisina y ox-NeuNac α 2-6Gal β 1-4(Fuca α 1-6)GlcNAc-Fc sin lisina y con lisina, respectivamente (Figura 10).

- 5 El MALDI-TOF en modo reflector negativo después del análisis de N-glicano del cetuximab galactosilado, sialilado y oxidado reveló la mayor señal en m/z 2104 correspondiente a G2F mono-sialilado que contiene ácido siálico oxidado (Figura 11A). La misma muestra en el modo reflector positivo reveló las señales mayores en m/z 1663, 1809 y 2060 correspondientes a G2, G2F y G2F mono-sialilada que contiene ácido siálico oxidado. Es decir, 7-aldehído-NeuAc.

Ejemplo 24. Conjugación de ácido levulínico a cetuximab

- 10 La amidación del ácido levulínico a grupos amino libres en cetuximab se realizó de la siguiente manera: a 5 mg (33 nmol) de cetuximab en PBS (200 μ l) se añadió un exceso de 10-30 molar de succinimidil éster de ácido levulínico (preparado como se describe en el Ejemplo 18) en ACN (8-25 μ l) y la mezcla se dejó reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente. Los reactivos de bajo peso molecular se eliminaron mediante una unidad de filtro centrífugo Amicon, 30 K, de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando PBS como eluyente de lavado.

- 15 Para analizar el éxito de la amidación de levulinato, se liberaron cadenas livianas de anticuerpos por desnaturalización de los anticuerpos con guanidina-HCl 6 M a 60 °C durante 0,5 horas. Los enlaces disulfuro se redujeron posteriormente con ditioneitol 0,1 M a 60 °C durante 0,5 horas. Las cadenas livianas se purificaron a partir de la mezcla de reacción con columnas Poros R1 miniaturizadas de fabricación propia con elución con ACN 60% en TFA 0,1% (5 μ l). El análisis de la cadena liviana se realizó mediante espectros de masas MALDI-TOF usando matriz de ácido sinapínico. El análisis mostró que 1-4 grupos de levulinato estaban unidos a la cadena liviana del anticuerpo.
- 20

Ejemplo 25. Conjugación de monometildolastatina (MODO) mediante el ligador de Val-Cit-PAB a cetuximab

Val-Cit-PAB-MODO

- 25 6,5 mg (8 μ mol) MODO en DMF (200 μ l), 2 exceso molar de Fmoc-Val-Cit-PAB-pnp, 0,3 mg (2 μ mol) de HoBt en DMF (28 μ l), 7 ml (40 μ mol) de diisopropiletilamina y 65 μ l DMF se agitaron durante dos días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que muestra la masa esperada para Fmoc-Val-Cit-PAB-MODO (m/z 1420 [M+Na]).

Fmoc se eliminó mediante la adición de 150 μ l de dietilamina y mediante agitación a temperatura ambiente durante la noche. El análisis de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico mostró la generación del producto desprotegido esperado (m/z 1198 [M+Na]).

- 30 Val-Cit-PAB-MODO se purificó mediante el instrumento HPLC purificador Äkta (GE Healthcare) con columna de fase inversa Gemini 5 μ m NX-C18 (21,1 x 250 mm, 110 Å, AXIA (Phenomenex)) se eluyó con gradiente de ACN en acetato de amonio acuoso.

Alquino-Val-Cit-PAB-MODO

- 35 15 mg (67 μ mol) de éster HHS de ácido 3-propargiloxipropiónico (Cambio, Dry Drayton, Cambs, UK) y 2 mg (24 μ mol) de hidrógeno carbonato de sodio se añadieron a la solución de Val-Cit-PAB-MODO (6,4 μ mol) en DMSO 75% (1 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos días. El producto se analizó por MALDI-TOF MS, lo que muestra el producto esperado (m/z 1308 [M+Na]).

- 40 Alquino-Val-Cit-PAB-MODO se purificó mediante el instrumento HPLC purificador Äkta (GE Healthcare) con una columna de fase inversa Gemini 5 μ m NX-C18 (4,6 x 250 mm, 110 Å (Phenomenex)) que se eluye con gradiente de ACN en acetato de amonio acuoso.

PEG-N₃-Cetuximab

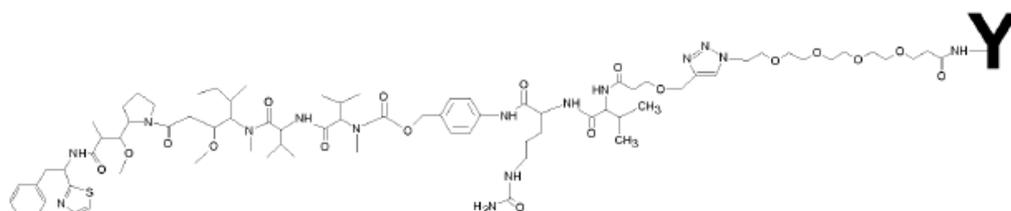
1 mg (6,7 nmol) de cetuximab en PBS (150 μ l) se incubó con 10 exceso molar de N₃-PEG-NHS (Pierce) en DMSO (9 μ l) durante 2 horas a temperatura ambiente. El N₃-PEG-NHS sin reaccionar se separó por unidad de filtro centrífugo Amicon, 30K.

- 45 Para verificar la unión de PEG-azida, se liberaron cadenas livianas de anticuerpos por desnaturalización de los anticuerpos con guanidina-HCl 6 M a 60 °C durante 0,5 horas, seguido de reducción de disulfuro con ditioneitol 0,1 M a 60 °C durante 0,5 horas. Las cadenas livianas se purificaron a partir de la mezcla de reacción con columnas Poros R1 miniaturizadas de fabricación propia mediante su elución con ACN 60% en TFA 0,1% (5 μ l). El análisis de la cadena liviana se realizó por MALDI-TOF MS, que confirmó la presencia de unidades de PEG-azida (+273 Da).

- 50 Val-Cit-PAB-MODO-Cetuximab

El conjugado del fármaco-anticuerpo del título (Esquema 11) se generó por una reacción click catalizada con cobre(II) que contiene 3,2 nmol de PEG-N₃-Cetuximab en PBS (90 μ l), 32 nmol de Alquino-Val-Cit-PAB-MODO en

DMSO (125 μ l), 1250 nmol de TGTA en MQ (90 μ l), 1250 nmol de ascorbato de Na en MQ (12,6 μ l), 250 nmol de CuSO_4 en MQ (5 μ l) y PBS (volumen de reacción 0,5 ml). La mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora a RT. El conjugado de anticuerpo se purificó en la unidad de filtro centrífugo Amicon, 30K.



Esquema 11. Estructura del conjugado Val-Cit-PAB-MODO-Cetuximab

- 5 Para estimar la relación fármaco-anticuerpo (DAR), el conjugado se sometió al asilamiento del fragmento Fc y la cadena liviana. Los fragmentos Fc se liberaron mediante la enzima FabRICATOR (Genovis AB, Lund, Suecia) durante la noche a 37 °C y se purificaron con puntas Poros R1. Los fragmentos Fc se eluyeron con ACN 60%, TFA 0,1% (5 μ l). Las cadenas livianas se liberaron con guanidina-HCl 6 M y ditiotreitól como anteriormente, y se recuperaron usando puntas Poros R1. Sobre la base del análisis MALDI-TOF MS de estos dominios de proteínas, la relación fármaco-anticuerpo fue en promedio de 1,5.

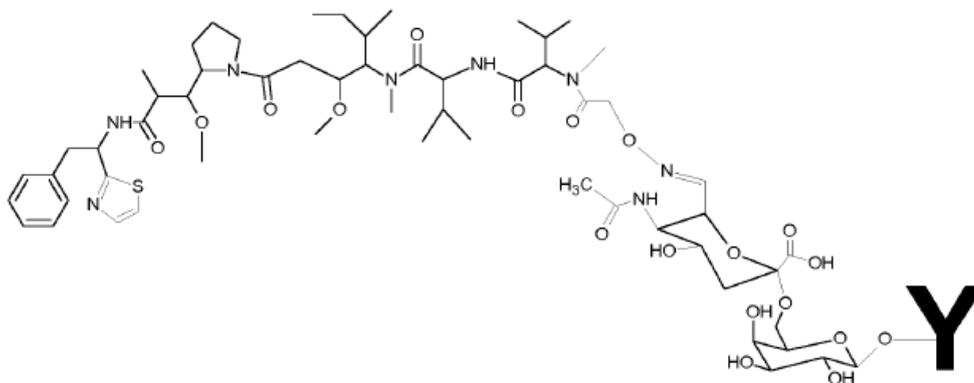
Ejemplo 26. Síntesis de derivados de hidroxilamina de monometildolastatina 10 y monometilauristatina F

- 10 mg de monometildolastatina (11,3 μ mol) o 10 mg monometilauristatina (11,8 μ mol) se disolvieron en acetonitrilo (2,5 ml). Se añadieron 10x de exceso molar de ácido Boc-aminooxiacético y DMT-MM. Se añadieron 25 μ l de diisopropiletilamina y las mezclas de reacción se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. El análisis MALDI-TOF MS mostró la formación de productos esperados, amida del ácido monometildolastatina-boc-aminooxiacético, m/z = 966 [M + Na], y amida del ácido monometilauristatina-boc-aminooxiacético, m/z = 927 [M + Na]. Las mezclas de reacción se secaron con un flujo de gas nitrógeno. El grupo protector de Boc se eliminó mediante la disolución de las mezclas de reacción en 2 ml de diclorometano: ácido trifluoroacético (12,5: 1) en hielo y la reacción se dejó continuar durante 4 horas. Las muestras se analizaron por MALDI: ácido monometildolastatina-aminooxiacético (MODO-AOAA), [M+Na] + m/z 866 y ácido monometilauristatina-aminooxiacético (MMAF-AOAA) [M + Na] + m/z 827. Los productos se secaron y purificaron por HPLC en una columna de fase inversa Gemini-NX-5u C-18 eluida con gradiente de acetonitrilo en tampón de acetato de amonio pH 5,6.

Ejemplo 27. Conjugación de MODO-AOAA y MMAF-AOAA a 7-aldehído-NeuAc-cetuximab

- 200 μ g de 7-aldehído-NeuAc-cetuximab (preparado como se describe en el Ejemplo 23) en tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,5 (90 μ l) se mezclaron con 100 de exceso molar de MODO-AOAA o 300 de exceso molar de MMAF-AOAA en DMSO (10 μ l). Las reacciones se dejaron proceder durante 18-120 h a temperatura ambiente.

El fragmento Fc del conjugado de MODO-AOAA-Cetuximab se aisló como se describe en el Ejemplo 25 y se analizó por MALDI-TOF MS. El espectro del fragmento Fc mostró una señal mayor en m/z 26637, correspondiente al producto de oxima esperado (Esquema 12).



Esquema 12. Estructura del conjugado MODO-AOAA-Cetuximab
Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa

El fragmento Fc del conjugado de MMAF-AOAA-Cetuximab se aisló como se describe en el Ejemplo 25 y se analizó por MALDI-TOF MS. El espectro del fragmento Fc mostró una señal mayor en m/z 26614, correspondiente al producto de oxima esperado.

5 **Ejemplo 28. Conjugación de MODO-AOAA a levulinil-cetuximab**

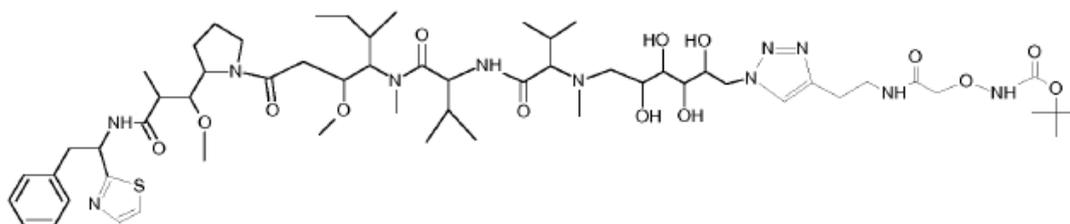
2,7 nmol de levulinil-cetuximab (preparado como en el Ejemplo 24) en tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,5 (100 μ l) se mezclaron con 100 de exceso molar de MODO-AOAA en DMSO (10 μ l). La reacción se dejó proceder 2d a temperatura ambiente y 4d a +37 °C. Para el análisis MALDI, las cadenas livianas del conjugado se aislaron como se describe en el Ejemplo 24 y se analizaron por MALDI-TOF MS (Fig. 12). El espectro muestra dos señales correspondientes a los conjugados de fármaco: m/z 24361 y m/z 25282, correspondientes a una y dos unidades de MO-DO-AOAA unidas en las cadenas livianas, respectivamente.

15 **Ejemplo 29. Conjugación de Boc-aminoxibutinilacetamida (Boc-ABAA) con N-(6-azido-6-deoxi-D-galactosil)-monometildolastatina 10 (N-(6-N₃-Gal)-MODO)**

Boc-ABAA se conjugó con N-(6-N₃-Gal)-MODO mediante la reacción de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (I).

La reacción contenía 2,5 μ mol de N-(6-N₃-Gal)-MODO, 6,3 μ mol de Boc-ABAA (2,5 x exceso molar en N-(6-N₃-Gal)-MODO), 25 μ mol de ascorbato de Na (10 x exceso molar en N-(6-N₃-Gal)-MODO) y 5 μ mol de CuSO₄ (2 x exceso molar en N-(6-N₃-Gal)-MODO). Boc-ABAA y N-(6-N₃-Gal)-MODO se disolvieron en DMSO y ascorbato de Na y CuSO₄ en MilliQ-H₂O antes de añadirse a la reacción. El volumen total de la reacción fue 117 μ l que contiene 64% de DMSO. La reacción se llevó a cabo durante 1,5 horas a RT. La conjugación se detuvo con 40 μ l de EDTA 0,5M pH 8 (20 μ mol EDTA).

El progreso de la reacción se analizó con MALDI-TOF MS usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en el modo reflector de ion positivo. La señal mayor se observó en m/z 1224,6, que corresponde al ion [M+Na]⁺ del producto de reacción click esperado (Esquema 13).



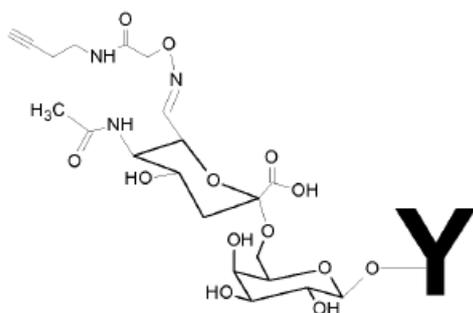
Esquema 13.

25 **Ejemplo 30. Conjugación de aminooxibutinilacetamida (ABAA) a 7-aldehído-NeuAc-cetuximab usando ligación de oxima**

2,67 mg (17,8 nmol) de 7-aldehído-NeuAc-cetuximab (Ejemplo 23) se incubó con 100x de exceso molar de ABAA

(1,78 μmol ; obtenido como se muestra en el Ejemplo 17) en tampón de acetato de sodio 0,2 M pH 5,5 (650 ml) durante la noche a temperatura ambiente. Se eliminó el ABAA sin reaccionar y el tampón se intercambió con PBS mediante varias adiciones de PBS en el concentrador Amicon Ultracel 30 K (Millipore).

5 Los fragmentos Fc del conjugado obtenido se aislaron como se describe en el Ejemplo 25, y se sometieron al análisis MALDI-TOF MS en la matriz de 2,5-dihidroxiacetofenona. La señal mayor se observó en m/z 25955, correspondiente a la oxima ABAA-ácido siálico en el fragmento Fc. (Esquema 14).



Esquema 14. Estructura de cetuximab-ABAA. Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa

10 En una reacción similar, ABAA se unió a cetuximab tratado con Endo S, posteriormente galactosilado, sialilado y oxidado (Ejemplo 23).

El análisis del fragmento Fc del producto de ligación de la oxima reveló una señal mayor en m/z 24703, correspondiente a una oxima de ABAA-ácido siálico en el fragmento Fc.

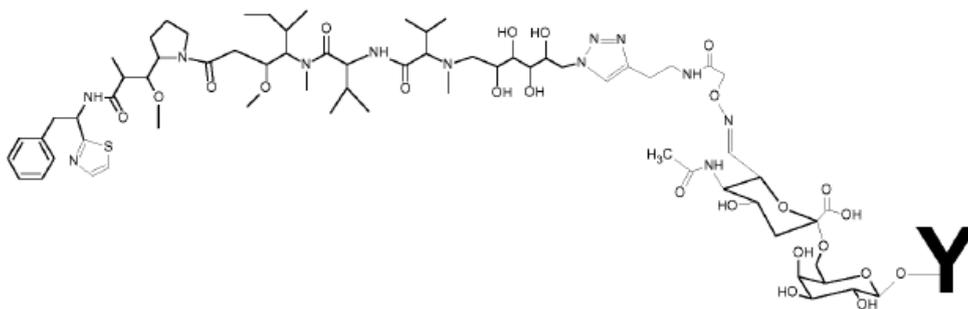
Ejemplo 31. Conjugación de Cetuximab-ABAA con N-(6-N₃-Gal)-MODO

15 Cetuximab-ABAA obtenido como se mostró anteriormente se conjugó con N-(6-N₃-Gal)-MODO usando una reacción de cicloadición azida-alquino.

20 La reacción contenía 1 mg (6,6 nmol) de anticuerpo-ABAA (en 195 μl PBS), 660 nmol de N-(6-N₃-Gal)-MODO (100 x exceso molar en anticuerpo-ABAA), 330 nmol de ascorbato de Na (50 x exceso molar en anticuerpo-ABAA), 66 nmol de CuSO₄ (10 x exceso molar en anticuerpo-ABAA) y 330 nmol de TGTA (50 x exceso molar en anticuerpo-ABAA). Ascorbato de Na, CuSO₄ y TGTA se disolvieron en MilliQ-H₂O y N-(6-N₃-Gal)-MODO en DMSO antes de la adición a la reacción. El volumen total de la reacción fue 250 μl que contiene 195 μl de PBS y DMSO 6%. La reacción se llevó a cabo durante dos horas a RT.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco resultantes (ADC) se purificaron y el tampón se intercambió a PBS mediante varias adiciones de PBS con el concentrador Amicon Ultracel 30 K (Millipore).

25 Los fragmentos Fc del ADC así obtenido se aislaron como se describe en el Ejemplo 25, y se sometieron al análisis MALDI-TOF MS en la matriz de 2,5-dihidroxiacetofenona. El producto de conjugación mayor se observó en m/z 26902, correspondiente a la oxima N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico en el fragmento Fc (ver Esquema 15).



Esquema 15. Estructura de ADC de la oxima N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico (MODO-ABAA-cetuximab). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa

En una reacción click similar, N-(6-N₃-Gal)-MODO se unió a ABAA-cetuximab tratado con Endo S (MODO-ABAA-cetuximab-S; Ejemplo 30).

5 El análisis MS del fragmento Fc del producto de reacción click reveló una señal mayor en m/z 25641, correspondiente a la oxima de N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico en el fragmento Fc (Fig. 13).

Ejemplo 32. Citotoxicidad *in vitro* de los conjugados de anticuerpo-fármaco

10 La línea celular de cáncer de ovario humano SKOV-3 (EGFR⁺ HER2⁺), la línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello HSC-2 (EGFR⁺) y la línea celular de carcinoma colorrectal resistente a múltiples fármacos LS513 (EGFR⁺) provenían de ATCC (Manassas, Virginia, USA). Las células se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* con las células se realizaron como anteriormente. Los resultados de un ensayo ejemplar se muestran en la Figura 14A, en la que se compararon las citotoxicidades de los conjugados monometildolastatina 10 (MODO) glicoconjugados MODO-ABAA-cetuximab y MODO-ABAA-cetuximab-S con cetuximab-VC-MODO (Val-Cit-PAB-MODO-cetuximab) que contiene un ligador sensible a la valina-citrulina peptidasa para las lisinas de anticuerpos en contraste con el resto ligador hidrófilo para los residuos de glicano. Ambos MODO-ABAA-cetuximab y MODO-ABAA-cetuximab-S fueron más efectivos contra las células de cáncer de cabeza y cuello HSC-2 que cetuximab-VC-MODO.

20 La Figura 14 muestra la citotoxicidad *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco con células cancerosas. Todas las concentraciones de fármaco en el eje y se normalizaron al contenido real de fármaco de monometildolastatina 10 en cada conjugado. A) Las citotoxicidades de MODO-ABAA-cetuximab y MODO-ABAA-cetuximab-S (conjugados de monometildolastatina 10 (MODO) glicoconjugados) y cetuximab-VC-MODO (Val-Cit-PAB-MODO-cetuximab) se compararon con el control (PBS) en células de cáncer de cabeza y cuello HSC-2. B) Las citotoxicidades de MODO-ABAA-cetuximab y MODO-ABAA-cetuximab-S se compararon con cetuximab-VC-MODO en células de cáncer colorrectal LS513 resistentes a múltiples fármacos.

25 En otros experimentos, los valores de IC₅₀ se establecieron para el conjugado preparado de anticuerpo y fármaco de cetuximab y dolastatina 10 de acuerdo con el Esquema 6 contra las células cancerosas como se describió anteriormente: IC₅₀ contra las células SKOV-3 era de 1 nM a 10 nM e IC₅₀ contra las células HSC-2 era de 1nM a 10nM en los experimentos.

30 En el experimento descrito en la Figura 14B, las citotoxicidades de MODO-ABAA-cetuximab y MODO-ABAA-cetuximab-S se compararon con cetuximab-VC-MODO en células de cáncer colorrectal LS513 resistentes a múltiples fármacos. Tanto el MODO-ABAA-cetuximab como el MODO-ABAA-cetuximab-S (que contiene un enlazador que libera el fármaco con el resto del enlazador hidrofílico por acción de la glucohidrolasa dentro de las células) fueron más efectivos que el cetuximab-VC-MODO (que contiene un ligador que libera un fármaco no conjugado dentro de las células).

Ejemplo 33. Síntesis de MODO-TREA (1-[MODO-Gal]-1,2,3-triazol-4-etilamina)

35 12 μmol de N₃-Gal-MODO (Ejemplo 1) en DMSO (40 μl), 2x exceso molar de 1-amino-3-butino en DMSO (20 μl), 3,1 mg (19 mmol) de CuSO₄ en MQ (50 μl), 19,2 mg de ascorbato de Na en MQ (50 μl), 90 μl de DMSO y 400 μl MQ se agitaron a RT durante 2,5 horas. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que muestra la masa esperada para MO-DO-TREA (m/z 1051 [M+Na]).

40 MODO-TREA se purificó mediante el instrumento HPLC purificador Äkta (GE Healthcare) con la columna de fase inversa Gemini 5 μm NX-AXIA-C18 (21,2 x 250 mm, 110 Å (Phenomenex)) que se eluye con gradiente de ACN en

acetato de amonio acuoso.

Ejemplo 34. Síntesis de MODO-TREA-DBCO

8 μmol de MODO-TREA, 5x de exceso molar de DBCO-éster NHS (Jena Bioscience) en DMF (1 ml) y 16 μl de diisopropiletilamina se agitaron a RT durante tres horas. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que muestra la masa esperada para MODO-TREA-DBCO (m/z 1338 [M+Na]).

MODO-TREA-DBCO se purificó mediante el instrumento HPLC purificador Äkta (GE Healthcare) con columna de fase inversa Gemini 5 μm NX-AXIA-C18 (21,2 x 250 mm, 110 Å (Phenomenex)) que se eluye con gradiente de ACN en acetato de amonio acuoso.

10 Ejemplo 35. Síntesis de MODO-TRSLac (1-(MODO-Gal)-1,2,3-triazol-4-[9-sialillactosa])

N_3 -NeuNAc α 2,6lactosa se obtuvo mediante la α 2,6-sialilación enzimática de lactosa usando CMP-9-deoxi-9-azido-NeuNAc (Ejemplo 3) y α 2,6-sialiltransferasa de *P. damsela* (Sigma). El producto trisacárido se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DE-AE Sefarosa de flujo rápido (GE Healthcare) usando un gradiente de bicarbonato de amonio.

15 9 μmol de N_3 -NeuNAc α 2,6lactosa en MQ (100 μl), 1,5x de exceso molar de propargil-Gal-MODO en DMSO (300 μl), 4 mg (25 μmol) de CuSO_4 en MQ (50 ml), 32,8 mg (44 μmol) de TGTA en MQ (50 μl) 8,9 mg ascorbato de Na (45 μmol) en MQ (50 μl) y 50 μl de MQ se agitaron a RT durante 4 horas. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que muestra la masa esperada para MODO-TRSLac (m/z 1653 [M+Na]).

20 MODO-TRSLac se purificó mediante el instrumento HPLC purificador Äkta (GE Healthcare) con columna de fase inversa Gemini 5 μm NX-AXIA-C18 (21,2 x 250 mm, 110 Å (Phenomenex)) que se eluye con gradiente de ACN en acetato de amonio acuoso.

Ejemplo 36. Síntesis de MODO-TRSLac-Lys

25 \sim 8 μmol MODO-TRSLac en DMSO (1,6 ml), \sim 50 exceso molar de lisina en MQ (150 μl), 44 mg (707 μmol) NaCNBH_3 en MQ (174 μl) y 76 μl de diisopropiletilamina se agitaron a 60 °C durante dos días.

MODO-TRSLac-Lys se purificó mediante el instrumento HPLC purificador Äkta (GE Healthcare) con la columna de fase inversa Gemini 5 μm NX-AXIA-C18 (21,2 x 250 mm, 110 Å (Phenomenex)) que se eluye con gradiente de ACN en acetato de amonio acuoso.

Ejemplo 37. Síntesis de MODO-TRSLac-Lys-DBCO

30 \sim 6 μmol de MODO-TRSLac-Lys, \sim 5 exceso molar de DBCO-éster NHS en DMF (72 μl), 10 ml de diisopropiletilamina y 450 μl de DMF se agitaron a RT durante la noche. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que muestra la masa esperada para MODO-TRSLac-Lys-DBCO (m/z 2093 [M-H+2Na]⁺).

35 MODO-TRSLac-Lys-DBCO se purificó mediante el instrumento HPLC purificador Äkta (GE Healthcare) con la columna de fase inversa Gemini 5 μm NX-AXIA-C18 (21,2 x 250 mm, 110 Å (Phenomenex)) que se eluye con gradiente de ACN en acetato de amonio acuoso.

Ejemplo 38. Síntesis de DM1 carboximetilado (DM1-S-CH₂COOH)

40 3,9 μmol de DM1, 2,5 de exceso molar de ácido yodoacético en DMF (33 μl), 67 μl de DMF y 90 μl de NH_4HCO_3 200 mM se agitaron a RT durante una hora. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico que muestra la masa esperada para DM1-S-CH₂COOH (m/z 818 [M+Na]).

Ejemplo 39. Síntesis de DM1-DBCO

45 \sim 3,9 μmol de DM1-S-CH₂COOH, 3,5 de exceso molar de DBCO-NH₂ (Sigma) en DMF (200 μl) y 26 mg (95 μmol) de DMT-MM en DMF (500 μl) se agitaron a RT durante la noche. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que muestra la masa esperada para DM1-DBCO (m/z 1076 [M+Na]). DM1-DBCO se purificó por cromatografía de fase inversa como se describe en el Ejemplo 25.

Ejemplo 40. Síntesis de MODO-Val-Cit-PAB-DBCO

50 \sim 2 μmol MODO-Val-Cit-PAB (Ejemplo 25), \sim 5 de exceso molar de DBCO-éster NHS en DMF (126 μl) y 3,5 μl de diisopropiletilamine se agitaron a RT durante tres horas. La mezcla de reacción bruta se analizó por espectros de

masa MALDI-TOF usando la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que muestra la masa esperada para MODO-Val-Cit-PAB-DBCO (m/z 1485 [M+Na]).

MODO-Val-Cit-PAB-DBCO se purificó por cromatografía de fase inversa como se describe en el Ejemplo 25.

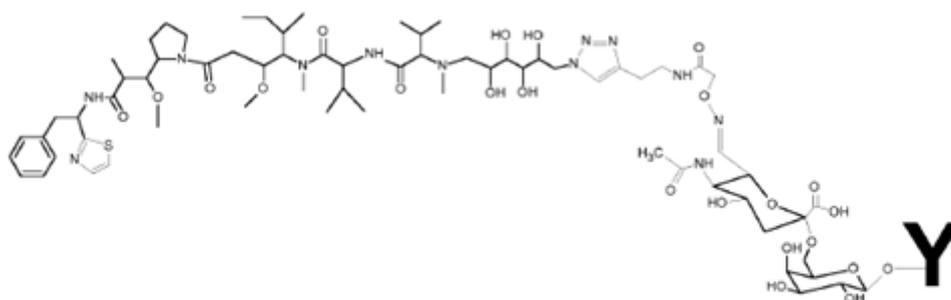
5 **Ejemplo 41. Conjugación de aminooxibutirilacetamida-monometildolastatina 10 (ABAA-MODO) con 7-aldehído-NeuNAc-trastuzumab**

10 Modo-Boc-aminooxibutirilacetamide (Boc-ABAA-MODO, esquema 13) se preparó como se describe en el Ejemplo 29, y se purificó por extracción de fase sólida en cartucho de extracción Bond-Elut C18. El grupo protector Boc se eliminó mediante la incubación en diclorometano-TFA (12,5:1), y el producto MODO-ABAA se aisló por cromatografía de fase inversa usando la columna Gemini NX C18 (Phenomenex) usando un gradiente de acetonitrilo en acetato de amonio 20 mM, pH 5,6.

15 Fc N-glicanos de trastuzumab se galactosilaron y sialilaron esencialmente como en el Ejemplo 21. El análisis Fc de la muestra tratada con β 1,4-galactosiltransferasa y α 2,6-sialiltransferasa reveló la mayor señal en m/z 25846 correspondiente a NeuNAc-G2F-Fc sin lisina C-terminal. Aproximadamente 95% de las galactosas se sialilaron. Los ácidos siálicos posteriormente se oxidaron selectivamente a 7-aldehído-NeuNAc con peryodato 1 mM como en el Ejemplo 23. El análisis Fc del trastuzumab galactosilado, sialilado y oxidado reveló la mayor señal en m/z 25821 correspondiente a 7-aldehído-NeuAc-G2F-Fc.

20 La conjugación de ABAA-MODO con los ácidos siálicos oxidados de tratuzumab se realizó mediante la ligación oxima con modificaciones menores como en el ejemplo 30. Brevemente, 180 mg (1,2 nmol) de 7-aldehído-NeuNAc-trastuzumab se incubó con 75x de exceso molar de ABAA-MODO en DMSO 10%, tampón de acetato de sodio 0,2 M pH 4,5 (300 ml) durante la noche a temperatura ambiente. El ABAA sin reaccionar se eliminó y el tampón se intercambiò a PBS mediante varias adiciones de PBS en el concentrador Amicon Ultracel 30 K (Millipore).

25 El análisis Fc de ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-trastuzumab (ver Esquema 16) reveló la mayor señal en m/z 26908 correspondiente a ABAA-MODO-7-aldehído-NeuAc-G2F-Fc y la señal menor en m/z 27990 correspondiente a 7-aldehído-NeuAc-G2F-Fc con dos ABAA-MODO unidos. Se observó una desaparición casi completa de la señal del 7-aldehído-NeuAc-G2F-Fc.



Esquema 16. Estructura de ADC de la oxima N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-ácido siálico (MODO-ABAA-trastuzumab). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa del N-glicano

30 **Ejemplo 42. Conjugación de aminooxibutirilacetamida-monometildolastatina 10 (ABAA-MODO) a 7-aldehído-NeuNAc-anti-CD33**

GCM011, un anticuerpo anti-CD33 humanizado con un sitio adicional de N-glicosilación en la secuencia de la región variable de la cadena pesada, se produjo como sigue. Las secuencias de ADN sintéticas optimizadas para la expresión de células CHO se solicitaron a GeneArt (Life Technologies) que codifican 1) cadena pesada y 2) cadena liviana del anticuerpo y estas secuencias se clonaron en el vector pCHO1,0 con péptidos señal N-terminales y mutación E74N en La secuencia de la cadena pesada (Glu-74 cambió a Asn):

35 1) Secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido señal MAVLGLLFCLVTFPSCVLS fusionado a la SEQ ID NO: 38, y

2) Secuencia de ADN ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido señal MVSTPQFLVFLFWIPASRS fusionado a la SEQ ID NO: 37.

Para la expresión de anticuerpos, las células CHO-S FreeStyle™ se transfectaron con los vectores usando el

Sistema de expresión FreeStyle™ Max (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sobrenadante se recogió de las células en el día 10 y los anticuerpos se purificaron con cromatografía de afinidad con proteína G. El análisis MALDI-TOF MS de los productos de reacción digeridos con FABRICATOR, así como los N-glicanos liberados por N-glicosidasa, demostraron que el sitio adicional de N-glicosilación en la cadena pesada Asn-74 estaba 100% glicosilado con N-glicanos de tipo complejo y el anticuerpo expresado así contenía cuatro N-glicanos/molécula de anticuerpo.

La galactosilación y sialilación de N-glicano se realizó con anti-CD33 GCM011 esencialmente como en el Ejemplo 21. Se liberaron fragmentos Fc de una pequeña alícuota de muestra con la enzima Fabricator como en el ejemplo 25. Se liberaron cadenas pesadas variables con guanidina-HCl 6 M y ditioneitol, y se recuperaron usando puntas Poros R1. El análisis MALDI-TOF MS de Fc purificado reveló la mayor señal en m/z 25865 correspondiente a NeuNAc-G2F-Fc sin lisina. El análisis MALDI-TOF MS de la cadena pesada variable purificada reveló la mayor señal en m/z 27359 correspondiente a NeuNAc2-G2F-Fab HC.

Los ácidos siálicos en GCM011 galactosilado y sialilado se oxidaron como en el Ejemplo 23 y la conjugación ABAA-MODO a ácidos 7-aldehído-siálicos se realizó mediante ligación de oxima como en el Ejemplo 41. Los fragmentos Fc se analizaron como en el Ejemplo 25 y reveló una señal en m/z 26889 correspondiente a ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-G2F-Fc y una señal menor en m/z 27965 correspondiente a 7-aldehído-NeuAc-G2F-Fc con dos ABAA-MODO unidos.

En otro experimento, la oxidación selectiva del peryodato y la conjugación ABAA-MODO con ácidos 7-aldehído-siálicos se realizó a anti-CD33 GCM011 no modificado (es decir, no se realizó galactosilación o sialilación antes de la oxidación). La oxidación de peryodato se realizó como en el Ejemplo 23 excepto que se usó peryodato 3 mM. La conjugación ABAA-MODO se realizó como en el Ejemplo 41, excepto que se usó un 18x de exceso molar de ABAA-MODO con el anticuerpo. Los N-glicanos Fab HC se analizaron como en el Ejemplo 41 y revelaron señales en m/z 28543 y 28667 correspondientes a ABAA-MODO-7-aldehído-NeuAc-G2F-Fab HC y ABAA-MODO-7-aldehído-NeuAc2-G2F-Fab HC. Se detectaron señales menores en m/z 26292 y 26757 correspondientes a 7-aldehído-NeuAc-G2F-Fc con dos ABAA-MODO unidos y 7-aldehído-NeuAc2-G2F-Fab HC con dos ABAA-MODO unidos.

Ejemplo 43. Producción de trastuzumab afucosilado

El trastuzumab afucosilado se produjo en células CHO-S (Invitrogen) mediante la transfección transitoria de las células con ADN de cadena pesada y liviana de trastuzumab de acuerdo con las instrucciones de CHO-S de Invitrogen. Antes de la transfección y durante la producción de anticuerpos AV39 (un inhibidor de la síntesis de GDP-fucosa; Glykos Finland Ltd., Helsinki, Finlandia) se añadió a las células para evitar la fucosilación de N-glicano. En el día 5 después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes y se purificó el anticuerpo con la columna HiTrap Proteína G (GE Healthcare) usando fosfato de sodio 0,02 M pH 7 como tampón de unión y ácido cítrico 0,1 M pH 2,6 como tampón de elución. Las fracciones que contienen IgG se mezclaron y neutralizaron con Na₂HPO₄ 1 M. La inhibición de la fucosilación se confirmó mediante análisis de N-glicano como en el Ejemplo 8.

Ejemplo 44. Conjugación de MODO-ABAA con 7-aldehído-NeuNAc-trastuzumab afucosilado

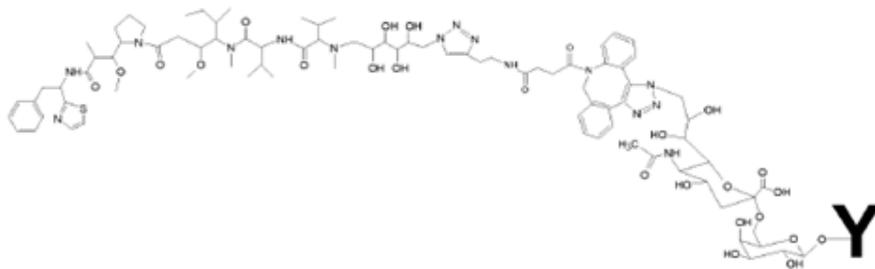
El trastuzumab afucosilado se galactosiló y sialiló como en el Ejemplo 21. El análisis Fc de la muestra tratada con β1,4-galactosiltransferasa y α-2,6-sialiltransferasa reveló la mayor señal en m/z 25700 correspondiente a Neu-NAc-G2-Fc sin lisina. El 85% de los N-glicanos estaban mono-sialilados. La oxidación selectiva de ácidos siálicos se realizó como en el Ejemplo 23 y MO-DO-ABAA se conjugó con ácidos 7-aldehído-siálicos como en el Ejemplo 41. El análisis Fc de ABAA-MODO-7-aldehído-NeuNAc-afucosil trastuzumab reveló la mayor señal en m/z 26754 correspondiente a ABAA-MODO-7-aldehído-NeuAc-G2-Fc sin lisina. Se observó la desaparición completa de la señal de 7-aldehído-NeuAc-G2F-Fc.

Ejemplo 45. Unión enzimática de CMP-9-deoxi-9-azido-NeuNAc a Fc N-glicanos de trastuzumab

Los Fc N-glicanos de trastuzumab (Herceptin) se galactosilaron con β1,4-galactosiltransferasa como en el Ejemplo 21. Posteriormente se usó α2,6-sialiltransferasa para sialilar galactosas terminales con 9-azido-NeuNAc usando CMP-9-deoxi-9-azido-NeuNAc (Ejemplo 3) como el sustrato donante. La reacción de sialilación se realizó como en el Ejemplo 21. El análisis Fc de la muestra tratada con β1,4-galactosiltransferasa y α2,6-sialiltransferasa reveló la mayor señal en m/z 25872 correspondiente a G2F-Fc con un residuo unido de 9-deoxi-9-azido-NeuNAc. La proporción de esta señal fue >90% de todas las señales.

Ejemplo 46. Conjugación de MODO-TREA-DBCO a Fc N-glicanos modificados de trastuzumab

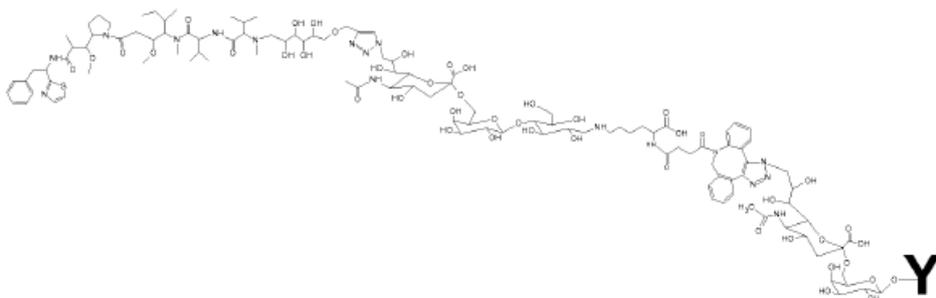
20 μM de trastuzumab galactosilado y 9-azido-sialilado (Ejemplo 45) se incubó con 400 μM de MODO-TREA-DBCO (Ejemplo 34) en PBS, DMSO 2,5%. La reacción se dejó proceder 16 h a temperatura ambiente después de lo cual el MODO-TREA-DBCO no conjugado se eliminó mediante adiciones repetidas de PBS y centrifugaciones a través de filtro centrífugo Amicon Ultracel 30 k. Se tomó una muestra para el análisis Fc, que reveló la mayor señal en m/z 27189 correspondiente a MODO-TREA-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab (ver Esquema 17). El grado de conjugación fue mayor de 95%.



Esquema 17 Estructura de MODO-TREA-DBCO ADC (MODO-TREA-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa del N-glicano

Ejemplo 47. Conjugación de MODO-TRSLac-Lys-DBCO a Fc N-glicanos modificados de trastuzumab

20 μ M de trastuzumab galactosilado y sialilado que porta 9-deoxi-9-azido-NeuNAc en los extremos terminales Fc-N-glicano (Ejemplo 45) se incubó con 400 μ M de MODO-TRSLac-Lys-DBCO (Ejemplo 37) en PBS. El 8% de DMSO y el 20% de propilenglicol estuvieron presentes en la reacción para evitar la precipitación de toxinas. La reacción se dejó proceder 16 h a temperatura ambiente, después de lo cual se eliminó MODO-TRSLac-Lys-DBCO no conjugado mediante adiciones repetidas de PBS y centrifugaciones a través de un filtro centrífugo Amicon Ultracel 30 k. Se tomó una muestra para el análisis Fc, que reveló la mayor señal en m/z 27923 correspondiente a MODO-TRSLac-Lys-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab. Las señales en m/z 25559 y 25871 revelaron la presencia de cantidades menores de G2F-trastuzumab y azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab



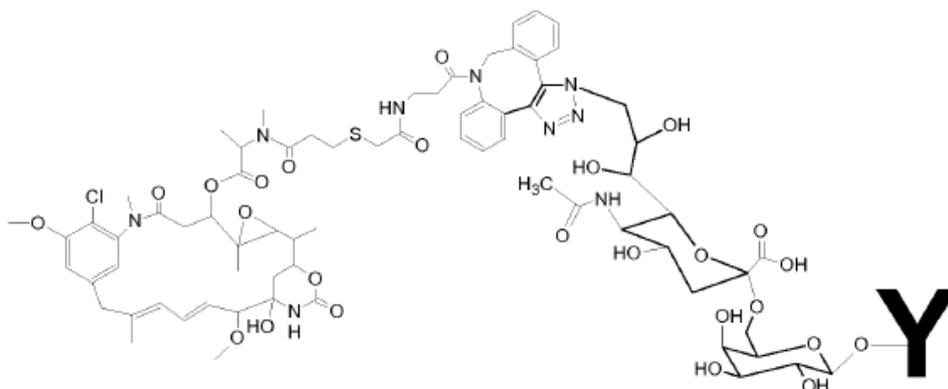
Esquema 18. Estructura de MODO-TRSLac-Lys-DBCO ADC (MODO-TRSLac-Lys-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-trastuzumab). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa del N-glicano

Ejemplo 48. Conjugación de DM1-DBCO con Fc N-glicanos modificados de cetuximab

Cetuximab se agalactosiló y sialiló con ácido 9-azido-N-acetilneuramínico esencialmente como se describe en los Ejemplos 9 y 10.

El análisis de MALDI-TOF MS del producto de reacción digerido con FabRICATOR implicó que aprox 74% de los N-glicanos se convirtieron en G2F con una azido-NeuAc, la porción restante es la glicofoma G2F.

DM1-DBCO (Ejemplo 39) se conjugó con N-glicanos 9-azido-NeuAc-cetuximab en una reacción click libre de cobre como se describe en el Ejemplo 46. Los productos de reacción se purificaron en los concentradores Amicon Ultracel 30 K (Millipore) en varias adiciones de 5% de manitol, 0,1% de Tween 20 en PBS y centrifugaciones posteriores. El análisis de MALDI-TOF MS de los ADC digeridos con FabRICATOR revelaron la reacción completa en los azido N-glicanos(ver Esquema 19).

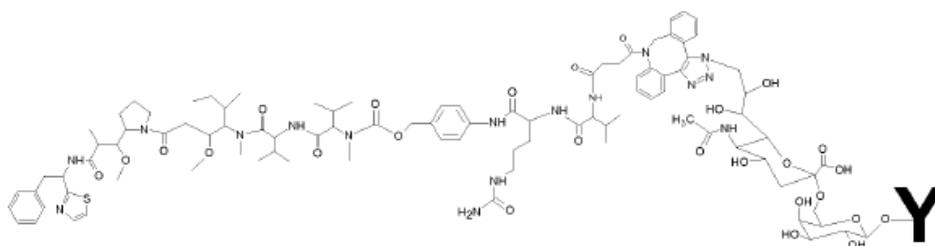


Esquema 19. Estructura de DM1-DBCO ADC (DM1-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-cetuximab). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa del N-glicano

Ejemplo 49. Conjugación de MODO-Val-Cit-PAB-DBCO con Fc N-glicanos modificados de cetuximab

5 Cetuximab se agalactosiló y sialiló con ácido 9-azido-N-acetilneuramínico esencialmente como se describe en los Ejemplos 9 y 10. El análisis de MALDI-TOF MS del producto de reacción digerido con FabRICATOR implicó que aproximadamente 74% de los N-glicanos se convirtieron en G2F con una azido-NeuAc, la porción restante es la glicofoma G2F.

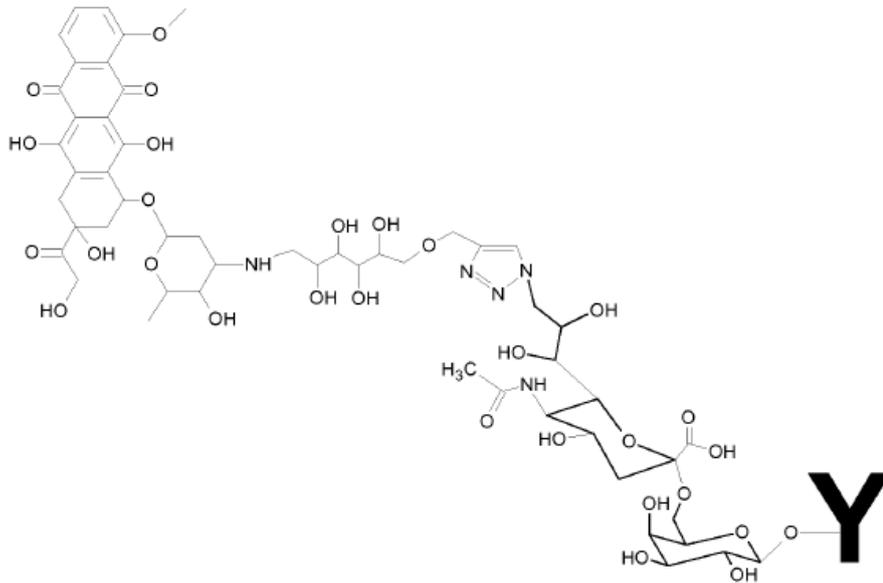
10 MODO-Val-Cit-PAB-DBCO (Ejemplo 40) se conjugó con N-glicanos 9-azido-NeuAc-cetuximab en una reacción click libre de cobre como se describe en el Ejemplo 46 (ve Esquema 20). Los productos de reacción se purificaron como se describió anteriormente en el Ejemplo 48. La mayor parte de los grupos azido reaccionaron como se analizó por análisis de MALDI-TOF MS de la parte Fc.



Esquema 20. Estructura de MODO-VC-DBCO ADC (MODO-Val-Cit-PAB-DBCO-9-azido-NeuNAc-G2F-cetuximab). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa del N-glicano.

Ejemplo 50. Síntesis de N-(6-O-propargil-D-galactosil)epirrubicinas y conjugación con 9-azido-NeuAc-cetuximab

15 La epirrubicina se alquila en N mediante aminación reductora en solución acuosa alcalina usando 6-propargil-6-deoxi-D-galactosa (Ejemplo 1) y cianoborohidruro de sodio. El producto N-(6-O-propargil-D-galactosil)-epirrubicina se aísla con cromatografía de fase inversa usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. N-(6-O-propargil-D-galactosil)-epirrubicina se conjuga con 9-azido-NeuAc-cetuximab (Ejemplo 10) en una reacción click catalizada por cobre como se describe en el Ejemplo 12 (ver el Esquema 21).



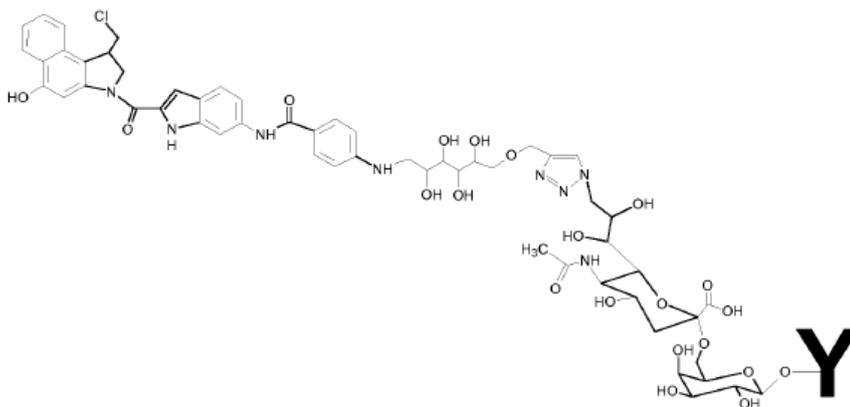
Esquema 21. Estructura de ADC de epirubicina (Epirubicina-N(Gal-triazol-NeuNAc-G2F-cetuximab). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galactosa del N-glicano.

Como es evidente para un experto en la técnica, otras toxinas similares, por ejemplo doxorubicina y daunorrubicina, se pueden derivarizar y conjugar de modo similar.

Ejemplo 51. Síntesis de N-(6-O-propargil-D-galactosil)duocarmicina, MA y conjugación con 9-azido-NeuAc-cetuximab

La duocarmicina MA (ALB Technology Limited) se trata con ácido trifluoroacético seco en DCM para eliminar el grupo Boc, y el derivado de duocarmicina no protegido se alquila en N mediante aminación reductora en solución acuosa alcalina usando 6-propargil-6-deoxi-D-galactosa (Ejemplo 1) y cianoborohidruro de sodio. El producto N-(6-O-propargil-D-galactosil)-duocarmicina MA se aísla con cromatografía de fase inversa usando por ejemplo, procedimiento descrito en el Ejemplo 1. N-(6-O-propargil-D-galactosil)-duocarmicina MA se conjuga con 9-azido-NeuAc-cetuximab (Ejemplo 10) en una reacción click catalizada con cobre como se describe en el Ejemplo 12 (ver Esquema 22).

Ejemplo 52. Experimento *in vivo*



Esquema 22. Estructura de ADC duocarmicina (Duocarmicina MA-N(Gal-triazol-NeuNAc-G2F-cetuximab)). Por claridad, solo se muestran los residuos de ácido siálico y galáctosa del N-glicano.

- Un estudio no aleatorizado de conjugados de anticuerpo anti-EGFR IgG1-fármaco (ADC; sustancias de prueba preparadas mediante la conjugación de monometildolastatina 10 a N-glicanos de anticuerpo cetuximab expresado en CHO para formar MODO-abaa-cetuximab como se describe en los Ejemplos anteriores) y el control (solución salina tamponada con fosfato, PBS) se realizó en un modelo de ratón desnudo con xenoinjerto para evaluar la eficacia *in vivo* de los ADC. El estudio se realizó de acuerdo con las pautas estándares de la instalación de prueba y fue aprobado por el comité ético apropiado (Universidad de Turku y Hospital de la Universidad de Turku, Turku, Finlandia).
- Se implantó por vía s.c. la línea celular de cáncer humano LS531 (EGFR⁺, carcinoma colorrectal con fenotipo resistente a múltiples fármacos) en un flanco de ratones Harlan HSD hembra y adulta: Foxn1nu atímicos desnudos. La primera dosis de las sustancias de prueba o control se administró cuando los tumores habían crecido por encima del volumen promedio de 100 mm³ (4-8 mm de diámetro). La longitud del tumor (L) y el ancho (W) se registraron en mm. Los volúmenes tumorales (V) en mm³ se calcularon de acuerdo con la fórmula $V = \frac{1}{2} L \times W^2$. Los ratones con tumores de diferentes tamaños se dividieron por igual en grupos de estudio para obtener grupos homogéneos (cuatro o cinco ratones en cada grupo).
- La sustancia de prueba se administró *i.v.* 10 mg/kg de ADC en PBS tres veces a intervalos de siete días y los animales de control recibieron PBS. El volumen tumoral, el peso del animal y los signos clínicos y el comportamiento general de los animales fueron seguidos dos veces por semana. Se registraron signos o comportamientos inusuales. El criterio de valoración del estudio fue a las ocho semanas después de la primera dosis.
- MODO-abaa-cetuximab mostró actividad antitumoral e inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento de control. El volumen promedio del tumor al final del experimento fue 189% en comparación con el volumen promedio en el momento de la primera inyección de ADC (100%) en ratones tratados con MODO-abaa-cetuximab, mientras que en los ratones de control que recibieron solo PBS, el volumen promedio del tumor al final del experimento fue del 375% en comparación con el volumen promedio en el momento de la primera inyección de ADC.
- Otro estudio no aleatorizado de conjugados de anticuerpo anti-EGFR IgG1-fármaco se llevó a cabo en un modelo de ratón desnudo de xenoinjerto para evaluar la eficacia *in vivo* de los ADC. Las sustancias de prueba se prepararon mediante la conjugación de monometildolastatina 10 a N-glicanos de cetuximab expresado en CHO y cetuximab expresado en CH tratado con Endo S para formar el conjugado de MODO-abaa-cetuximab y N-(6-N₃-Gal)-MODO-(triazol)-ABAA-oxima de ácido siálico-cetuximab tratado con Endo S (MODO-abaa-EndoS-cetuximab), respectivamente, como se describe en los ejemplos anteriores. El tratamiento de control fue PBS sin ADC. El estudio se realizó de acuerdo con las pautas estándares de la instalación de prueba y fue aprobado por el comité ético apropiado (Universidad de Turku y Hospital de la Universidad de Turku, Turku, Finlandia).
- Se implantó por vía s.c la línea celular de cáncer humano HSC-2 (EGFR⁺, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas) en un flanco de ratones Harlan HSD hembra y adulta: Foxn1nu atímicos desnudos. La primera dosis de las sustancias de prueba o control se administró cuando los tumores habían crecido por encima del volumen promedio de 100 mm³ (4-8 mm de diámetro). La longitud del tumor (L) y el ancho (W) se registraron en mm. Los

volúmenes tumorales (V) en mm³ se calcularon de acuerdo con la fórmula $V = \frac{1}{2} L \times W^2$. Los ratones con tumores de diferentes tamaños se dividieron por igual en grupos de estudio para obtener grupos homogéneos (cinco ratones en cada grupo).

5 La sustancia de prueba se administró *i.v.* 10 mg/kg de ADC en PBS tres veces a intervalos de siete días y los animales de control recibieron PBS. El volumen tumoral, el peso del animal y los signos clínicos y el comportamiento general de los animales fueron seguidos dos veces por semana. Se registraron signos o comportamientos inusuales. El criterio de valoración del estudio fue a las ocho semanas después de la primera dosis.

10 MODO-abaa-cetuximab y MODO-abaa-EndoS-cetuximab mostró actividad antitumoral e inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento de control. El volumen promedio del tumor al final del experimento fue 220% y 175% en comparación con el volumen promedio en el momento de la primera inyección de ADC (100%) en ratones tratados con MODO-abaa-cetuximab y MODO-abaa-EndoS-cetuximab, mientras que en los ratones de control que recibieron solo PBS, el volumen promedio del tumor al final del experimento fue mayor de 375% en comparación con el volumen promedio en el momento de la primera inyección de ADC.

Ejemplo 53. Depuración plasmática en ratón

15 La farmacocinética de la depuración plasmática de los conjugados de fármaco-anticuerpo y el anticuerpo total se estudia en ratas Sprague-Dawley. Los animales se tratan mediante inyección en vena de la cola en bolo (pulso IV). Se recolectan aproximadamente 300 µl de sangre entera a través de la cánula yugular, o con un stick de cola, en vasos anticoagulantes de litio/heparina en cada punto de tiempo: 0 (predosis), 10 y 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 24 y 36
20 horas; y 2, 3, 4, 7, 14, 21 y 28 días después de la dosis. El anticuerpo total se mide mediante ELISA, por ejemplo, mediante el revestimiento con el dominio extracelular de la proteína blanco y detección con un conjugado de anticuerpo anti-Fc-HRP humano (ECD/GxhuFc-HRP). El conjugado del fármaco-anticuerpo se mide por ELISA, por ejemplo, mediante el revestimiento con un anticuerpo anti-fármaco o anti-Fc y detección con un conjugado de dominio extracelular-biotina y un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante.

25 Ejemplo 54. Conjugación de aminooxibutirilacetamida-monometilolastatina 10 (ABAA-MODO) con 7-aldehído-NeuNAc-cetuximab

El cetuximab sialilado se preparó como se describe en el Ejemplo 10. Se preparó cetuximab oxidado con peryodato como se describe en el Ejemplo 23, y el 7-aldehído-NeuNAc-cetuximab así obtenido se conjugó mediante ligación de oxima con ABAA-MODO (Ejemplo 41). El análisis por MS de los HC-glicanos reveló que de los N-glicanos del HC Asn-88 aprox. 50% portaba una oxima ABAA-MODO y aprox. 50% portaba dos oximas ABAA-MODO, y del dominio Fc N-glicanos aprox. 80% portaba una oxima ABAA-MODO mientras que el 20% no había reaccionado. Por lo tanto, el producto de reacción compuesto por conjugados de anticuerpo-fármaco con entre 2 y 6 moléculas de fármaco por anticuerpo, en otras palabras, 2, 3, 4, 5 o 6 moléculas de fármaco por anticuerpo, con una relación promedio de fármaco a anticuerpo de 4,6.

35 Ejemplo 55. Conjugación de aminooxibutirilacetamida-monometilolastatina 10 (ABAA-MODO) con 7-aldehído-NeuNAc-GCM012

El GCM012 sialilado se preparó como se describe en el Ejemplo 10. Se preparó GCM012 oxidado con peryodato como se describe en el Ejemplo 23, y el 7-aldehído-NeuNAc-GCM012 así obtenido se conjugó mediante ligación de oxima con ABAA-MODO (Ejemplo 41). El análisis por MS de los LC-glicanos reveló que de los N-glicanos del Asn-18 >90% portaba dos oximas ABAA-MODO y <10% portaba una oxima ABAA-MODO. Por lo tanto, la relación fármaco a anticuerpo fue mayor que en el conjugado de anticuerpo-fármaco del Ejemplo 54 previo. De acuerdo con el análisis MS el producto de reacción compuesto de los conjugados de anticuerpo-fármaco con entre 2 a 6 moléculas de fármaco por anticuerpo, en otras palabras 2, 3, 4, 5 o 6 moléculas de fármaco por anticuerpo.

45 La citotoxicidad *in vitro* del conjugado MODO-ABAA-GCM012 se estableció con la línea celular de cáncer de ovario humano SKOV-3 como se describe en el Ejemplo 14. Se encontró que la IC50 contra las células SKOV-3 estaba entre 1 nM y 10 nM.

Como está claro para una persona experta en la técnica, la invención no se limita a los ejemplos y realizaciones descritos anteriormente, sino que las realizaciones pueden variar libremente dentro del alcance de las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Glykos Finland Oy

<120> CONJUGADOS DE GLICOPROTEÍNA-CARGA ÚTIL TÓXICA

<130> P-WO78038M

55

ES 2 759 503 T3

5 <150> FI20135451
 <151> 2013-05-02
 <150> FI20136020
 <151> 2013-10-14
 <160> 40

<170> BiSSAP 1,2

10 <210> 1
 <211> 1210
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> Receptor EGF, NP_005219,2 humano

<400> 1

```

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1      5      10
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20      25      30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35      40      45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50      55      60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65      70      75      80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85      90      95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100     105     110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115     120     125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130     135     140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145     150     155     160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165     170     175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180     185     190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195     200     205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210     215     220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225     230     235     240
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245     250     255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260     265     270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275     280     285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
  
```

ES 2 759 503 T3

290						295						300							
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu				
305					310						315								320
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val				
				325							330								335
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn				
			340					345						350					
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp				
		355					360							365					
Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr				
		370					375							380					
Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu				
385					390						395								400
Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp				
			405						410						415				
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln				
		420					425							430					
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu				
		435					440							445					
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser				
		450				455					460								
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu				
465					470						475								480
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu				
			485						490						495				
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro				
			500					505							510				
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn				
		515					520								525				
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly				
		530				535									540				
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro				
545					550						555								560
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro				
			565						570						575				
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val				
			580					585							590				
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp				
		595					600								605				
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys				
		610				615									620				
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly				
625					630						635								640
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu				
			645						650										
Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Arg	Arg	His				
			660						665										
Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Glu	Leu				
		675					680								685				
Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asn	Gln	Ala	Leu	Leu				
		690				695									700				
Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ser				
705					710						715								
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu				
			725								730								
Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser				
			740						745										
Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Ser				
		755					760								765				
Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser				
		770				775									780				
Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Met	Pro	Phe	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp				
785						790									800				

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815
 Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830
 Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845
 Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860
 Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880
 Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990
 Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
 995 1000 1005
 Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe
 1010 1015 1020
 Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala
 1025 1030 1035 1040
 Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln
 1045 1050 1055
 Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp
 1060 1065 1070
 Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro
 1075 1080 1085
 Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser
 1090 1095 1100
 Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser
 1105 1110 1115 1120
 Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro
 1125 1130 1135
 Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp
 1140 1145 1150
 Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp
 1155 1160 1165
 Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn
 1170 1175 1180
 Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val
 1185 1190 1195 1200
 Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
 1205 1210

<210> 2

<211> 1255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Receptor HER2, NP_004439,2 humano

ES 2 759 503 T3

<400> 2

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

ES 2 759 503 T3

1				5					10					15	
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys
			20					25					30		
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His
		35					40					45			
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val
65					70						75				80
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu
				85					90					95	
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
			100					105					110		
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro
		115					120					125			
Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser
	130					135						140			
Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln
145					150						155				160
Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn
				165					170					175	
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys
			180					185					190		
His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser
		195					200					205			
Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys
	210					215					220				
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys
225					230					235					240
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu
				245					250					255	
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val
		260						265					270		
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg
		275					280					285			
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu
	290					295					300				
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln
305					310					315					320
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys
				325					330					335	
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu
			340					345					350		
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys
		355					360					365			
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp
	370					375					380				
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe
385					390					395					400
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro
				405					410					415	
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg
			420					425					430		
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu
		435					440						445		
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly
	450					455					460				
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val
465					470					475					480
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr
				485					490					495	
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His
			500					505						510	

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655
 Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670
 Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780
 Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800
 Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815
 Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830
 Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845
 Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860
 Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895
 Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925
 Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930 935 940
 Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960
 Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975
 Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990
 Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005
 Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu

ES 2 759 503 T3

1010						1015						1020							
Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly				
1025						1030					1035								1040
Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly			
				1045						1050						1055			
Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg				
			1060					1065						1070					
Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly				
		1075					1080				1085								
Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His				
1090						1095					1100								
Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu				
1105					1110					1115									1120
Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln				
				1125					1130						1135				
Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro				
			1140				1145							1150					
Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu				
		1155					1160						1165						
Arg	Pro	Lys	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Val				
1170						1175					1180								
Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln				
1185					1190					1195									1200
Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala				
				1205					1210						1215				
Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg	Gly	Ala				
			1220				1225						1230						
Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr				
		1235					1240						1245						
Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro	Val													
1250						1255													

<210> 3

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada, cetuximab, INN7906H, de II MGT

<400> 3

ES 2 759 503 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 4
<211> 214

ES 2 759 503 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena liviana, cetuximab, INN7906L, from I MGT

<400> 4

10

```

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1      5      10
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
      20      25      30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
      35      40      45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65      70      75      80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
      85      90      95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100     105     110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115     120     125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

      130           135           140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145           150           155           160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165           170           175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180           185           190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195           200           205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210
    
```

15

<210> 5
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> cadena pesada, trastuzumab, 7637H, from I MGT

<400> 5

ES 2 759 503 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

ES 2 759 503 T3

<211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cadena liviana, trastuzumab, 7637L, from I MGT

<400> 6

10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

20

25

30

35

40

<210> 7
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cadena pesada, 7609H, rituximab

50

<400> 7

ES 2 759 503 T3

5 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 20 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 25 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 30 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 35 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 40 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 45 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 50 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 55 Pro Gly Lys
 450

60 <210> 8
 <211> 213

ES 2 759 503 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cadena liviana, 7609L, rituximab

<400> 8

10

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

20

25

30

35

40

<210> 9
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> 8017H|bevacizumab|

50

<400> 9

ES 2 759 503 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 10

ES 2 759 503 T3

<211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 8017L|bevacizumab|

<400> 10

10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

15

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

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

20

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

25

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

30

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

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

35

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

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

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

40

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

45

<210> 11
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> tositumomab Heavy

<400> 11

55

ES 2 759 503 T3

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 12
 <211> 210

ES 2 759 503 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> tositumomab liviana

<400> 12

10 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 15 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 20 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 25 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 30 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 35 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg
 210

40 <210> 13
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> 7783 M|etanercept

50 <400> 13

ES 2 759 503 T3

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 20 30
 5 Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
 35 40 45
 Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
 50 55 60
 10 Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
 65 70 75 80
 Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
 85 90 95
 15 Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
 100 105 110
 Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
 115 120 125
 Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
 130 135 140
 20 Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
 145 150 155 160
 Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
 165 170 175
 25 Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
 180 185 190
 His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
 195 200 205
 Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
 210 215 220
 30 Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 35 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 40 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 45 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 50 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 55 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 60 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

ES 2 759 503 T3

5 <210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 7860H|adalimumab
 10
 <400> 14

 15 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 20 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 30
 <210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> 7860L|adalimumab
 40
 <400> 15

 45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 50 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 16
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> adalimumab Cadena pesada, parcial
 60

ES 2 759 503 T3

<400> 16

5 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

10 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

15 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

20 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

25 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

30 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

35 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

<210> 17

<211> 214

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> adalimumab Cadena liviana

45

<400> 17

ES 2 759 503 T3

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 10 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 15 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 20 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 25 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 30 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

35 <210> 18
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> 8005H|alemtuzumab
 <400> 18

ES 2 759 503 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430 435
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 19

65

ES 2 759 503 T3

5
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 8005L|alemtuzumab

10
 <400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr
 15 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

45
 <210> 20
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 8122H|efalizumab

50
 <400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

ES 2 759 503 T3

	65				70					75				80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90				95		
5	Ala	Arg	Gly	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Thr	Thr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
				100					105					110		
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
			115					120					125			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
			130				135					140				
10	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	145					150					155				160	
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165						170					175	
15	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
				180				185					190			
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
			195					200					205			
20	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215						220				
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
	225					230					235				240	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245						250					255	
25	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
				260					265					270		
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
			275					280					285			
30	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295						300				
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
	305					310					315				320	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325							330				335	
35	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
				340					345					350		
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
			355					360					365			
40	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				370			375					380				
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
	385					390					395				400	
45	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				405						410					415	
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				420					425					430		
50	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
			435					440					445			
	Pro	Gly	Lys													
	450															

55 <210> 21
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> 8122L|efalizumab

<400> 21

ES 2 759 503 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ileyr
 35 40 45
 5 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 15 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 20 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 25 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 22
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 7602H|infiximab
 <400> 22
 40 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His
 20 25 30
 45 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala
 65 70 75 80
 55 Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 115
 <210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 60

ES 2 759 503 T3

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 7602L|infiximab
 <400> 23

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

15 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 20 25 30
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe
 85 90 95
 20 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys
 100 105

25 <210> 24
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> 3iu3A|basiliximab Fab|Quimérico| |VH-CH1
 <400> 24

35

40

45

50

55

ES 2 759 503 T3

5 Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met
 20 25 30
 His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 35 40 45
 10 Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly
 50 55 60
 Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 65 70 75 80
 15 Leu Ser Ser Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 85 90 95
 Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 20 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 25 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 30 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 210 215

35

<210> 25
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> 3iu3B|basiliximab Fab|Quimérico|L-KAPPA

45

<400> 25

50 Gln Ile Val Ser Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Met
 20 25 30

55

60

65

ES 2 759 503 T3

5 Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 10 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 100 105 110
 15 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 115 120 125
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 130 135 140
 20 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 145 150 155 160
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 165 170 175
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 180 185 190
 25 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 195 200 205
 Gly Glu
 210

30 <210> 26
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Basiliximab cadena pesada
 40 <400> 26

45
 50
 55
 60

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met
 20 25 30
 His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 35 40 45
 Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly
 50 55 60
 Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 85 90 95
 Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 27
<211> 451

ES 2 759 503 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> 8039H|omalizumab|Humanizado
 <400> 27

10	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly
				20					25					30		
15	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
			35					40					45			
	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Val
		50					55					60				
20	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His	Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly
				100					105					110		
25	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
			115					120					125			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
		130					135					140				
30	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	145					150					155					160
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165						170					175	
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
				180						185				190		
35	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
			195					200					205			

40

45

50

55

60

65

ES 2 759 503 T3

5 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 10 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 15 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 20 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 25 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 30 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 35 Pro Gly Lys
 450

40 <210> 28
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> 8039L|omalizumab
 <400> 28

ES 2 759 503 T3

5 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 10 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 15 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 20 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 25 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

 30 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 165 170 175
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 35

 40 <210> 29
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> 7164H|daclizumab

 <400> 29

ES 2 759 503 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 30
<211> 213
<212> PRT

ES 2 759 503 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> 7164L|daclizumab

<400> 30

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 15 35 40 45
 Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 20 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 25 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 30 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 35 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

40 <210> 31
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> nimotuzumab_HC

<400> 31

50 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 759 503 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Gly Gly Ile Asn Pro Thr Ser Gly Gly Ser Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Leu Trp Phe Asp Ser Asp Gly Arg Gly Phe Asp Phe
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Ser Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

60
 65

<210> 32
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> nimotuzumab_LC

ES 2 759 503 T3

<400> 32

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 10 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75 80
 15 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Tyr
 85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
 100 105 110
 Arg Glu Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 20 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 25 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 30 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

35 <210> 33
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> GCM012, cadena liviana, anticuerpo anti-EGFR

<400> 33

ES 2 759 503 T3

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10
 Asp Asn Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 10 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75 80
 15 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Tyr
 85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
 100 105 110
 Arg Glu Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 20 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 25 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

30 <210> 34
 <211> 446
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> epratuzumab_HC
 40 <400> 34

ES 2 759 503 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 35
<211> 219
<212> PRT

ES 2 759 503 T3

<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> epratuzumab_LC

<400> 35

10 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30
15 Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
20 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95
Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
25 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
30 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
35 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
40 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 36
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> lintuzumab_HC

<400> 36

50 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
55 20 25 30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
60 Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

ES 2 759 503 T3

	65				70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
5	Ala	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110		
	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115					120					125			
10	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
		130					135					140				
	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145				150						155					160
15	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175		
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180						185				190			
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195					200					205			
20	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
		210					215					220				
	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	225					230					235					240
25	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245						250					255	
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265					270			
	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
		275						280					285			
30	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
		290					295					300				
	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
	305					310					315					320
35	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325						330					335	
	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340					345						350		
40	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
			355					360					365			
	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
		370					375					380				
45	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	385					390					395					400
	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
			405						410					415		
	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420						425				430			
50	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			435					440					445			

55 <210> 37
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> lintuzumab_LC

<400> 37

ES 2 759 503 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 10 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 15 Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr
 100 105 110
 20 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160
 25 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190
 30 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 35 <210> 38
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> GCM011, cadena pesada, anticuerpo anti-CD33
 <400> 38

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25						30	
Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Asn	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100				105							110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130					135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145				150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
			165					170						175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
		180						185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	225				230					235					240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245					250					255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265					270		
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
		275					280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
	305				310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
			325						330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340				345						350		
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355					360					365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370					375					380				
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	385				390						395				400
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
			405						410					415	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420					425					430		
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
		435					440						445		

<210> 39
<211> 214

ES 2 759 503 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> 2G12_LC

 <400> 39

 10 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Thr Trp
 20 25 30
 15 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Phe
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln His Tyr Ala Gly Tyr Ser Ala
 85 90 95
 25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 30 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 35 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

 40 <210> 40
 <211> 453
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 2G12_HC

 50 <400> 40

ES 2 759 503 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Ala	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Ile	Leu	Ser	Cys	Gly	Val	Ser	Asn	Phe	Arg	Ile	Ser	Ala	His
5				20					25					30		
	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ala	Val
		50					55					60				
10	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asp	Leu	Glu	Asp	Phe	Val	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	His	Lys	Met	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
15	Ala	Arg	Lys	Gly	Ser	Asp	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Asp	Pro	Phe	Asp	Ala
				100					105					110		
	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Val	Val	Thr	Val	Ser	Pro	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
			115					120						125		
	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
		130					135						140			
20	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
	145					150						155				160
	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
					165					170					175	
25	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
				180					185						190	
	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
			195					200						205		
30	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
		210					215						220			
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
	225					230						235				240
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
						245				250					255	
35	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
				260					265						270	
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
			275					280						285		
40	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
		290					295						300			
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
	305					310						315				320
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
45						325				330					335	
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
				340					345					350		
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
			355					360						365		
50	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
		370						375						380		
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
	385					390						395				400
55	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
					405						410				415	
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser

ES 2 759 503 T3

			420					425				430			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
			435				440					445			
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
	450														

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un conjugado de la molécula de carga útil tóxica para glicoproteína representada por la fórmula I

5 [D-L-G]n-Gp Fórmula I

en la que

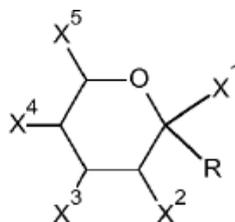
Gp es una glicoproteína que comprende un N-glicano, en la que el N-glicano comprende un residuo de GlcNAc unido por una unión β-N a una asparagina;

n es un número entero de 1 a 20;

10 D es una molécula de carga útil tóxica;

L es un grupo ligador que une covalentemente G a D; y

G es una estructura de sacárido representada por la fórmula II



Fórmula II

15 en la que

R es un enlace glicosídico al residuo de GlcNAc unido por una unión β-N a una asparagina;

X¹ es H;

X² es un enlace a L y X³ y X⁴ son cada uno OH;

X⁵ es CH₂OH;

20 en la que el procedimiento comprende las etapas de:

proporcionar una glicoproteína que comprende un N-glicano que comprende un sitio aceptor, en el que la glicoproteína que comprende el N-glicano que comprende el sitio aceptor se prepara mediante el contacto de una glicoproteína que comprende un N-glicano con una endoglicosidasa, en el que el N-glicano es un N-glicano tipo híbrido y la endoglicosidasa es EndoS2; y

25 hacer reaccionar una molécula donante con la glicoproteína que comprende el N-glicano que comprende el sitio aceptor en presencia de una glicosiltransferasa, en la que la glicosiltransferasa es β1,4-GalT1(Y285L) humana o β1,4-GalT1(Y285L) bovina;

en la que la molécula donante es UDP-2-(2-azidoacetamido)-2-deoxi-Gal (UDP-GalNAz).

30 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el N-glicano consiste en la la estructura representada por la fórmula IV



Fórmula IV

en la que (β -N-Asn) es una unión β -N a una asparagina y y es 0 o 1.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la glicoproteína es capaz de unirse a una molécula diana seleccionada del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD8, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD25, CD26, CD30, CD33, CD34, CD37, CD38, CD40, CD44, CD46, CD52, CD56, CD79, CD105, CD138, receptor del factor de crecimiento epidérmico 1 (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2/neu), receptor HER3 o HER4, LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, EpCAM, alfa4/beta7 integrina, alfa v/beta3 integrina que incluye las subunidades alfa o beta de la misma, factor tisular (TF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), glicoproteína IIb/IIIa, TGF-beta, interferón alfa (alfa-IFN), IL-8, receptor de IL-2, IgE, virus sincitial respiratorio (RSV), HIV-1 glicoproteína de envoltura gp120, N-glicanos tipo de alta manosa asociados a cáncer, antígeno del grupo sanguíneo Apo2, receptor de muerte, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptor mpl, CTLA-4, receptor de transferrina y proteína C.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la glicoproteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la glicoproteína es un anticuerpo IgG o un fragmento del mismo.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la glicoproteína es el anticuerpo bevacizumab, tositumomab, etanercept, trastuzumab, adalimumab, alemtuzumab, gemtuzumab, ozogamicin, efalizumab, rituximab, infliximab, abciximab, basiliximab, palivizumab, omalizumab, daclizumab, cetuximab, panitumumab, epratuzumab, 2G12, lintuzumab, nimotuzumab, GCM011, GCM012, o ibritumomab tiuxetano, o sus anticuerpos de glicofoma en el que el anticuerpo de glicofoma comprende uno o más de los sitios de N-glicosilación introducidos en la cadena liviana y/o pesada; o abagovomab, actoxumab, adecatimumab, afutuzumab, altumomab, amatuximab, anifrolumab, apolizumab, atinumab, atlizumab, atorolimumab, bazineuzumab, basiliximab, bavi-tuximab, belimumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bezlotoxumab, bimagrumab, bivatusumab, blinatumomab, blosozumab, brentuximab, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab, caplacizumab, capromab, carlumab, catumaxomab, CC49, cedelizumab, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab, conatumumab, concizumab, crenezumab, CR⁶261, dacetuzumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, detumomab, drozitumab, duligotumab, dupilumab, dusigitumab, ecomeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, eldelumab, elotuzumab, elsili-momab, enavatuzumab, enlimomab, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolizumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimomab, farletuzumab, fasinumab, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimomab, gevokizumab, girentuximab, glebatumumab, golimumab, gomiliximab, guselkumab, ibalizumab, icrucumab, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab, intetumumab, inolimomab, inotuzumab, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lambrolizumab, lampalizumab, lebrikizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab, lodelcizumab, lorvotuzumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, margetuximab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metelimumab, milatuzumab, minretu-momab, mitumomab, mogamulizumab, morolimumab, motavizumab, moxetumomab, muromonab, namilumab, nar-natumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimomab, nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, obinutuzumab, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, onartuzumab, oregov-omab, orticumab, otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, panobacumab, parsatuzumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pemtumomab, perakizumab, pertuzumab, pi-dilizumab, pinatuzumab, pintumomab, placulumab, polatuzumab, ponezumab, prilizumab, pritoxaximab, primumab, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab, secukinumab, seribantumab, setoxaximab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, sipilizumab, sirukumab, solanezumab, solitomab, sonpecizumab, sontuzumab, stamulumab, suvizumab, tabalumab, taca-tuzumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab, tefiba-zumab, tenatumomab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tildrakizumab, tigatuzumab, tocilizumab, toralizumab, tovetumab, tralokinumab, TRBS07, tregalizumab, tremelimumab, tucotuzumab, tuvurumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vantictumab, vapaliximab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimomab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, 2G12 (anti-HIV-1 glicoproteína de envoltura gp120), o zolimomab.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la glicoproteína comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más sitios aceptores.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el procedimiento además

comprende las etapas de:

hacer reaccionar un producto que se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 con un compuesto representado por la fórmula XIV



- 5 en la que D es la molécula de carga útil tóxica;
- L es el grupo ligador que une covalentemente L'' a D; y
- L'' es un alquino.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el producto del
- 10 procedimiento se une a una molécula que comprende el grupo ligador y la molécula de carga útil tóxica
- mediante la utilización de la conjugación click, tal como reacción de cicloadición de azida alquino catalizada
- con cobre (I) o química click sin cobre.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el procedimiento
- 15 comprende la etapa de proporcionar una composición que incluye la glicoproteína que comprende el N-
- glicano que comprende el sitio aceptor, y al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99% de todas las
- glicoproteínas de la composición que comprende un N-glicano comprenden un N-glicano que consiste en la
- estructura representada por la fórmula IV.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el procedimiento
- 20 comprende la etapa de proporcionar una composición que incluye la glicoproteína que comprende el N-
- glicano que comprende el sitio aceptor, y al menos 95%, o al menos 98%, o al menos 99%, o esencialmente
- 100% de las glicoproteínas totales de la composición que comprende un N-glicano comprenden al menos dos
- N-glicanos que comprenden al menos un sitio aceptor.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el grupo ligador es
- hidrófilo.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la molécula de carga útil
- 25 tóxica es una dolastatina, auristatina, doxorubicina, DM1, epirubicina, o duocarmicina.
14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que n es 1, 2, 4 o 6.
15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que n es 2-6.

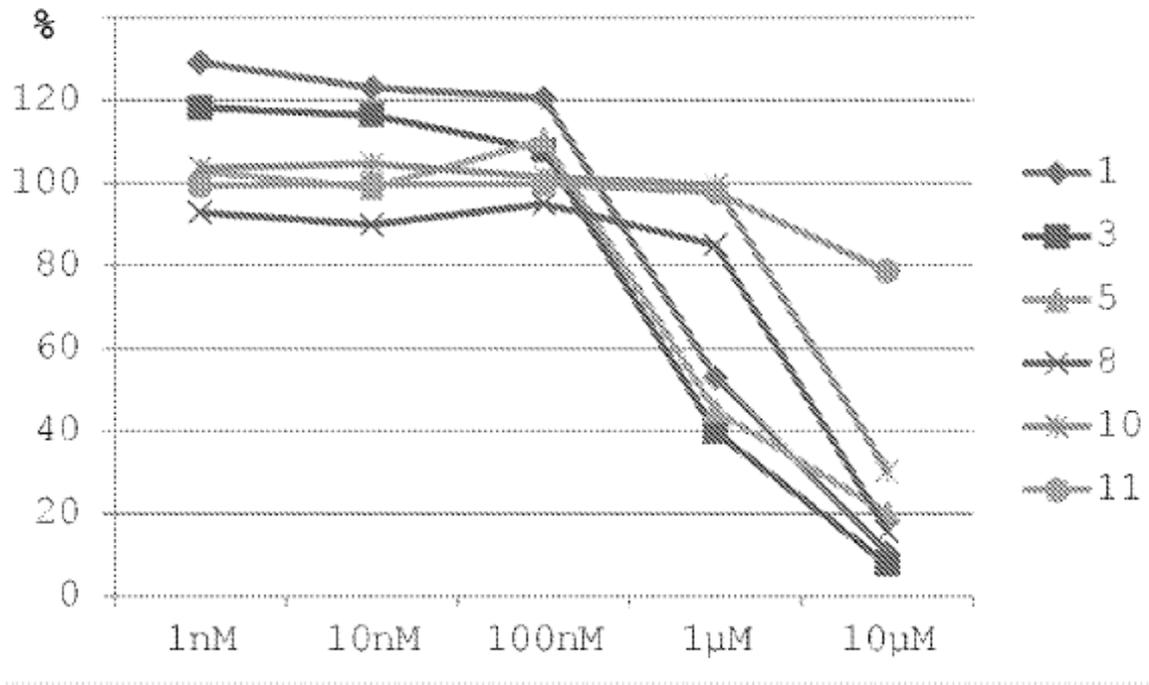


Figura 1

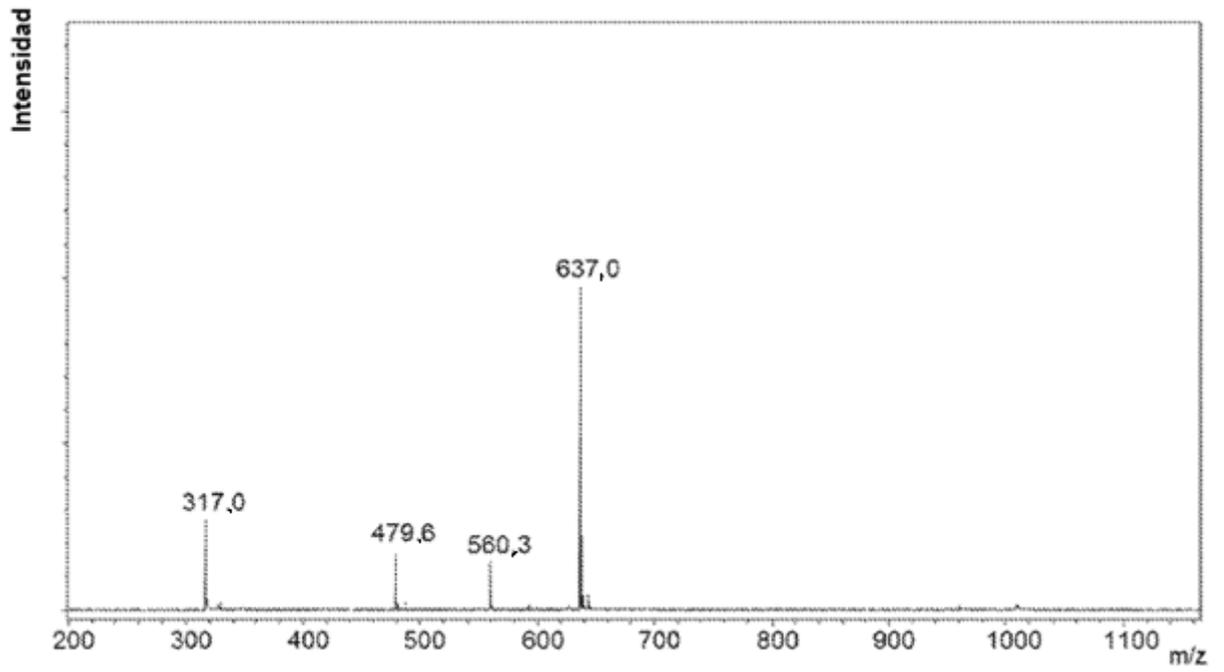


Figura 2

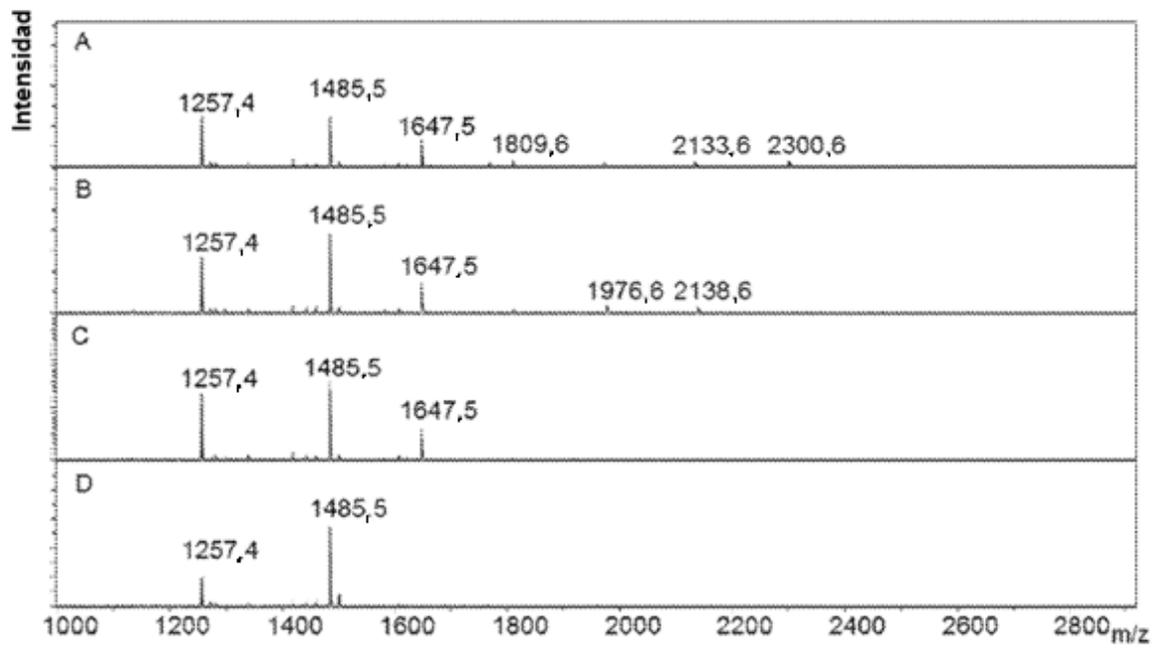


Figura 3

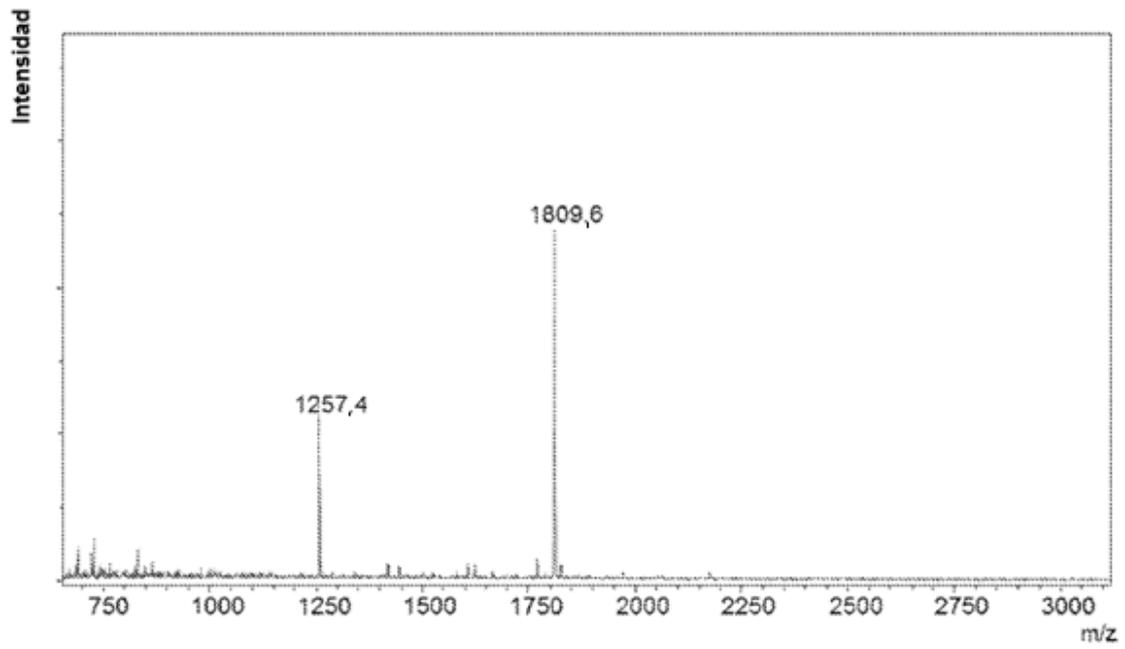


Figura 4

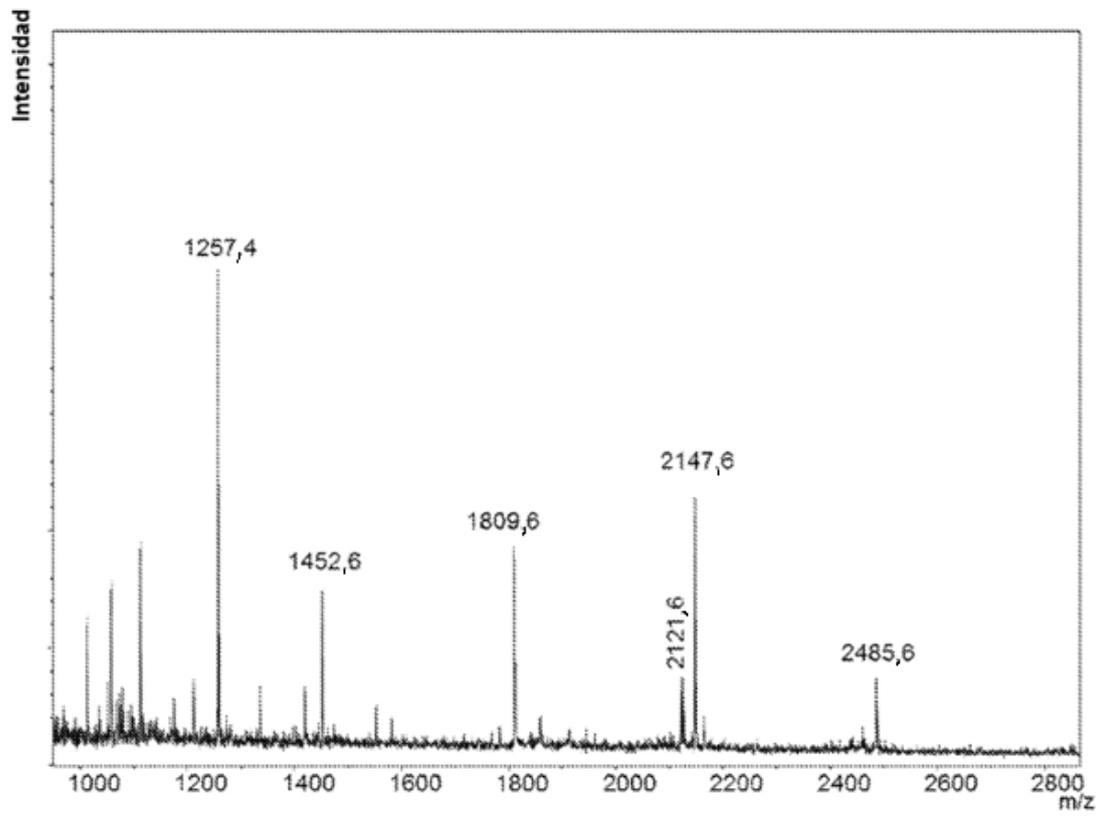


Figura 5

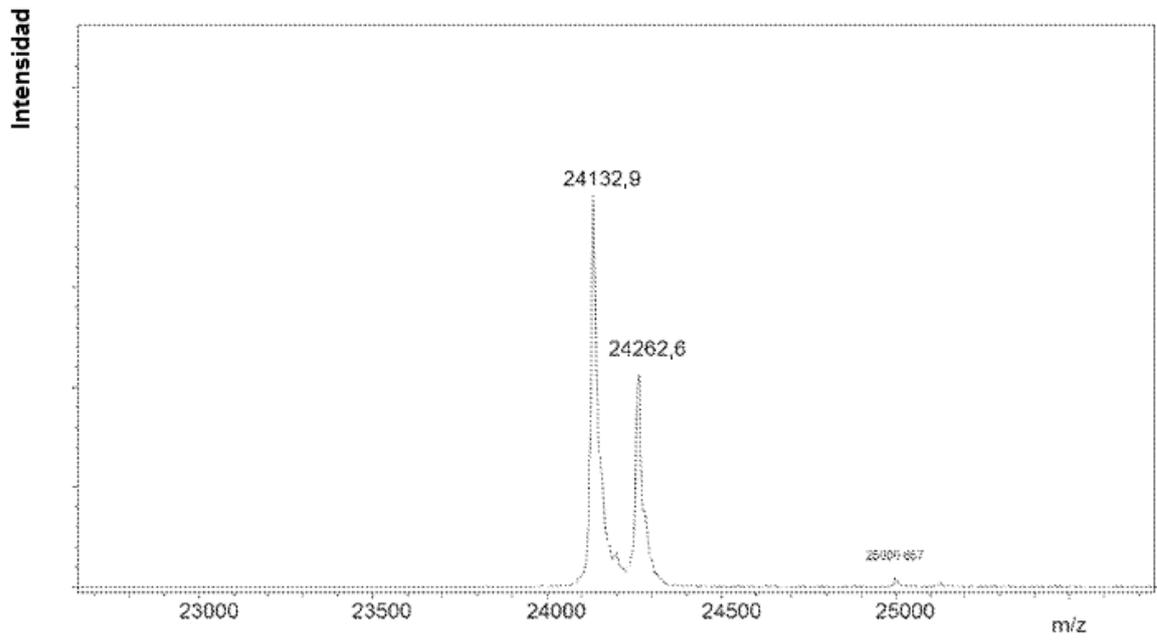


Figura 6

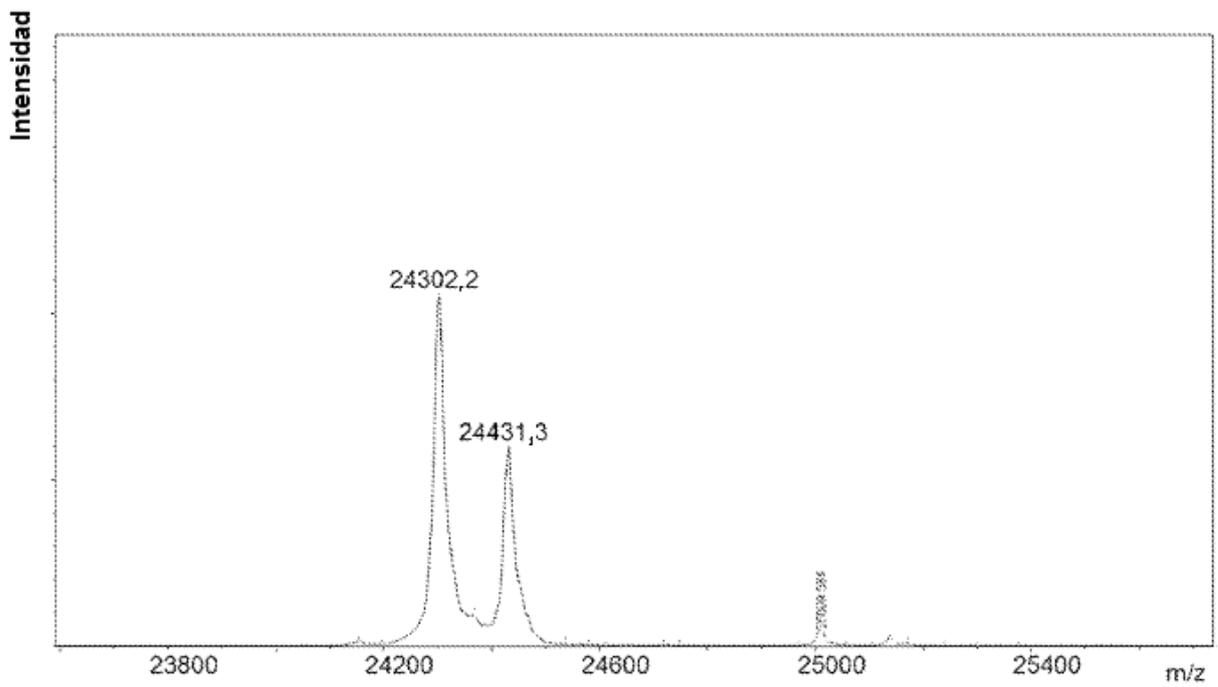


Figura 7

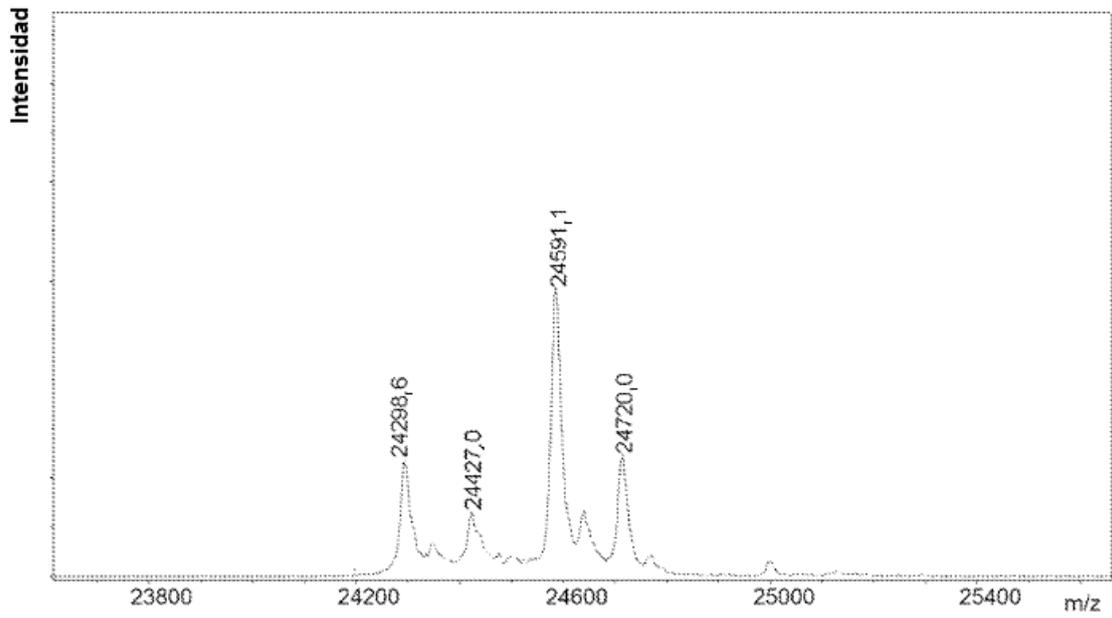


Figura 8

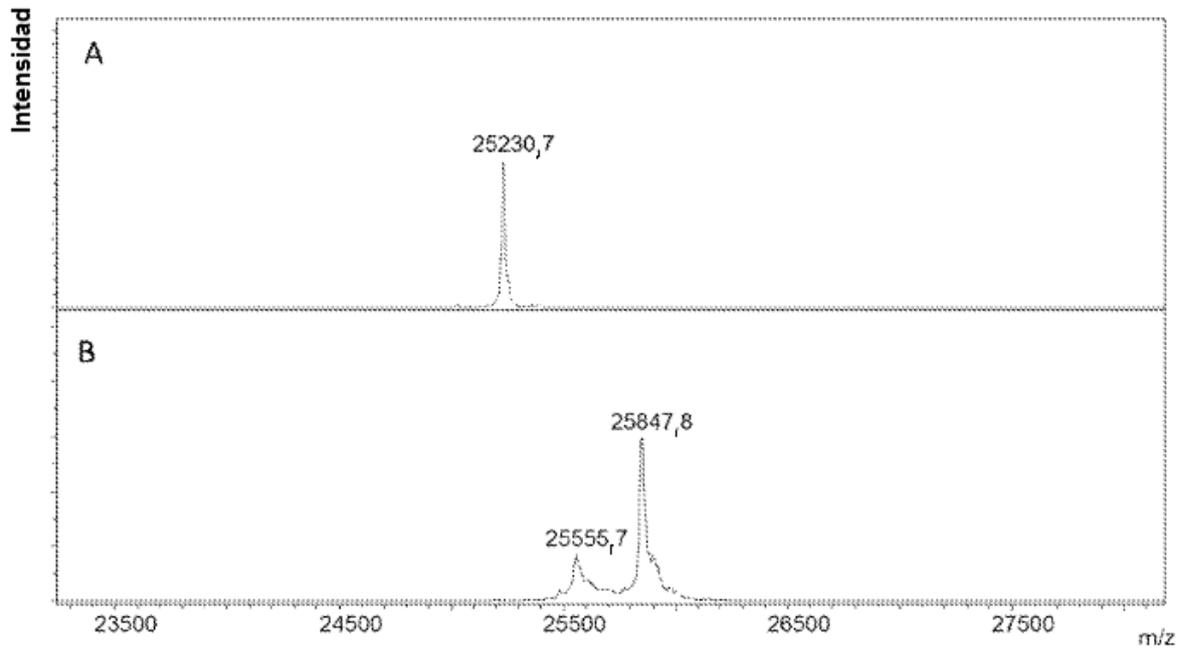


Figura 9

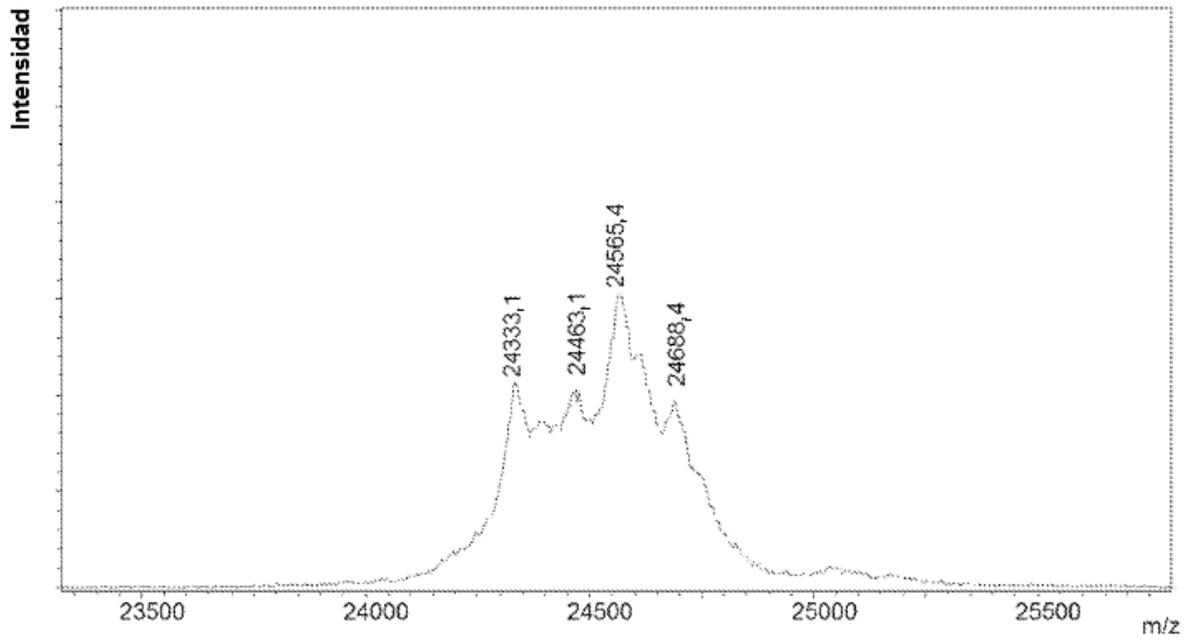


Figura 10

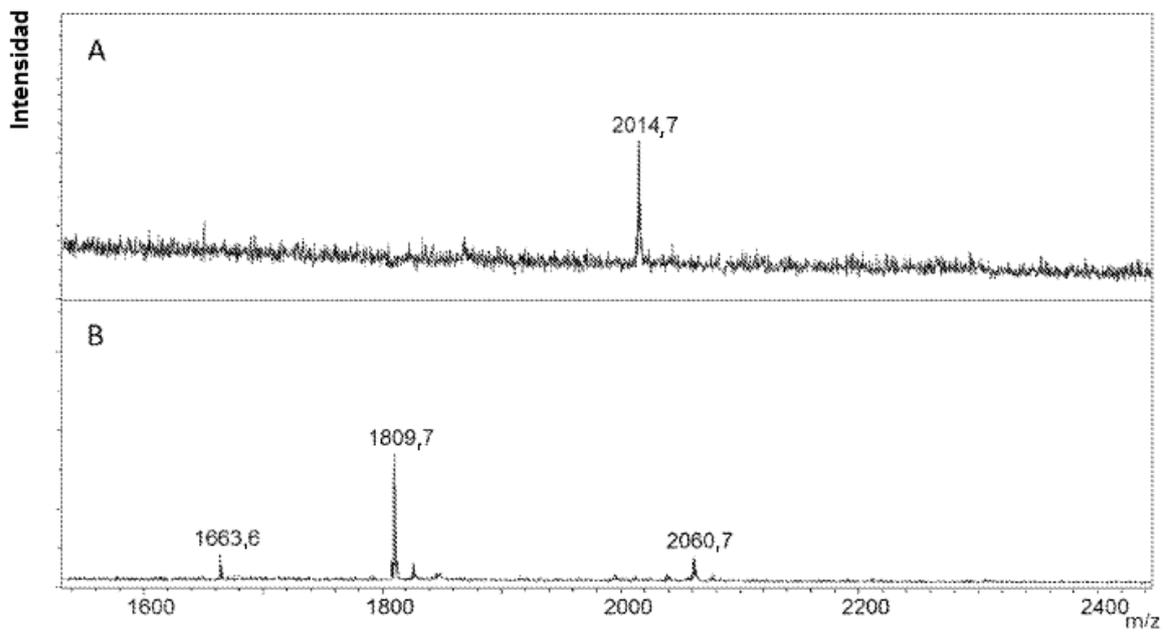


Figura 11

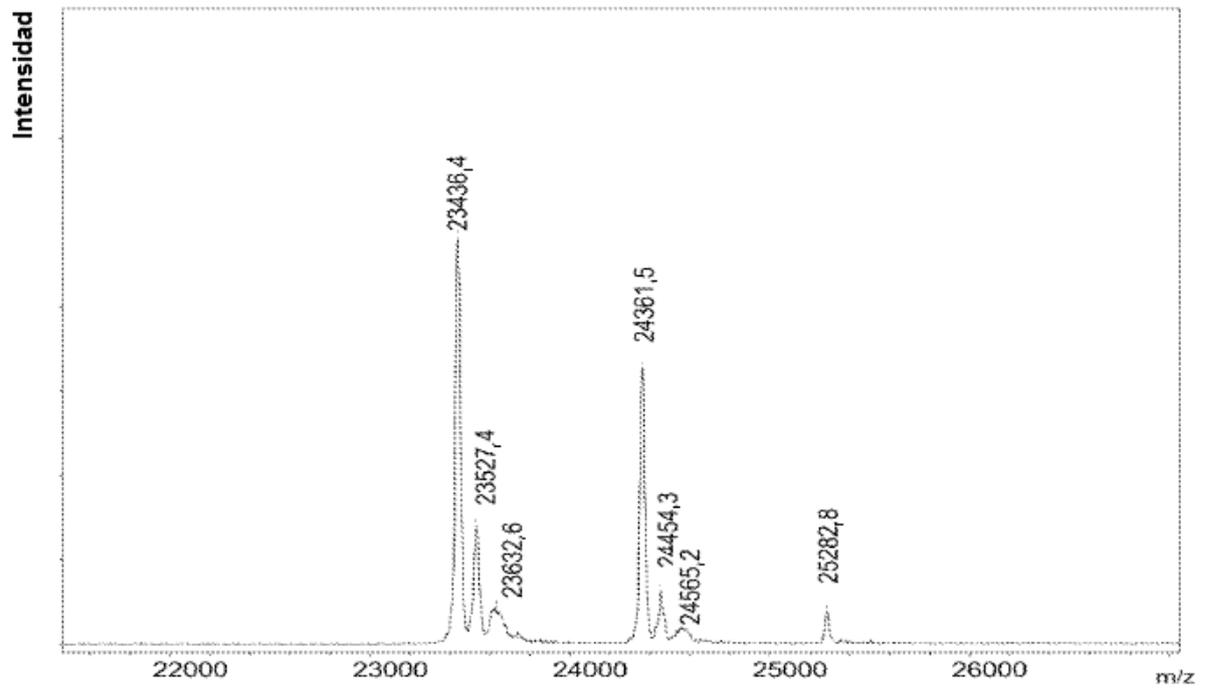


Figura 12

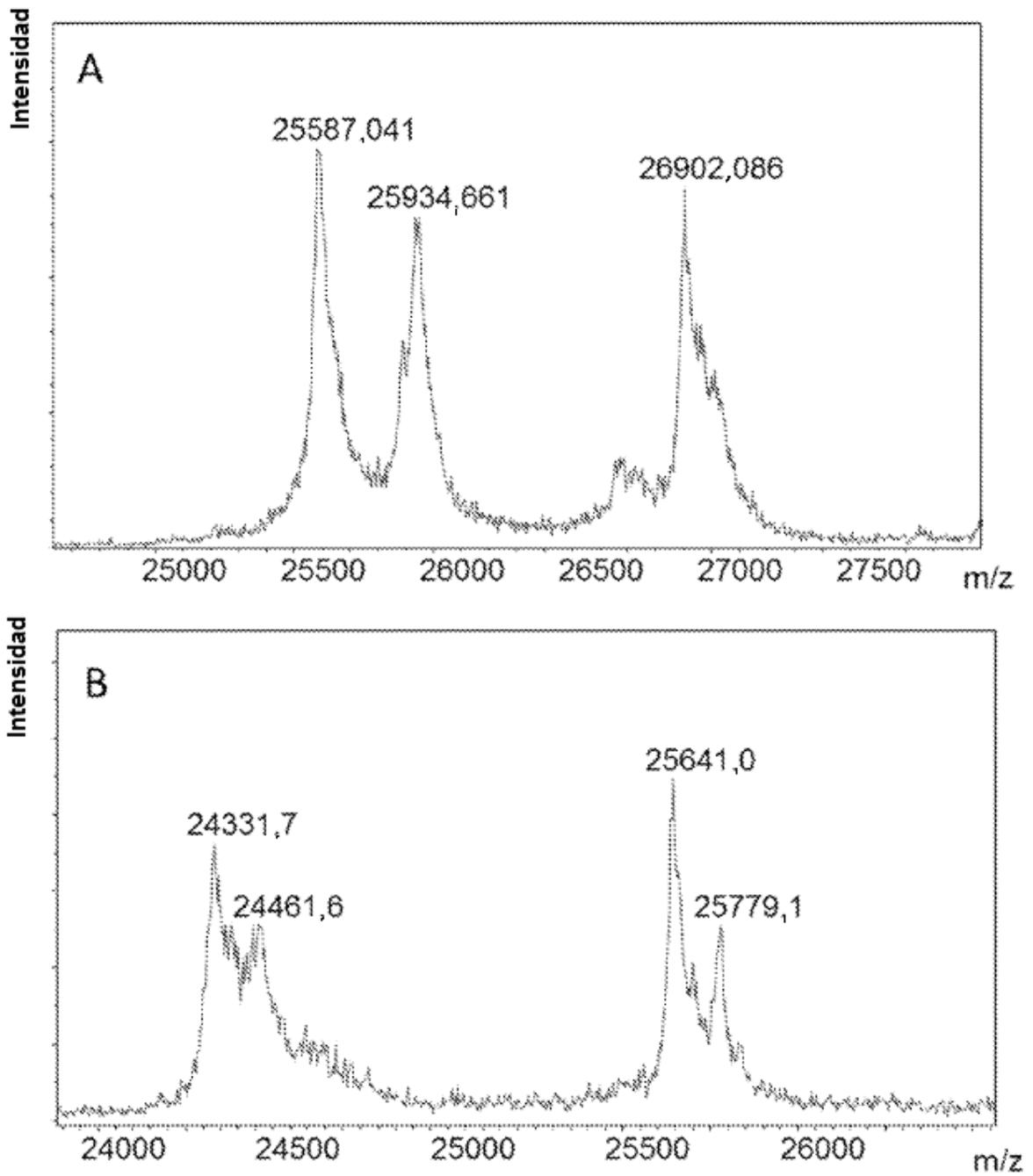
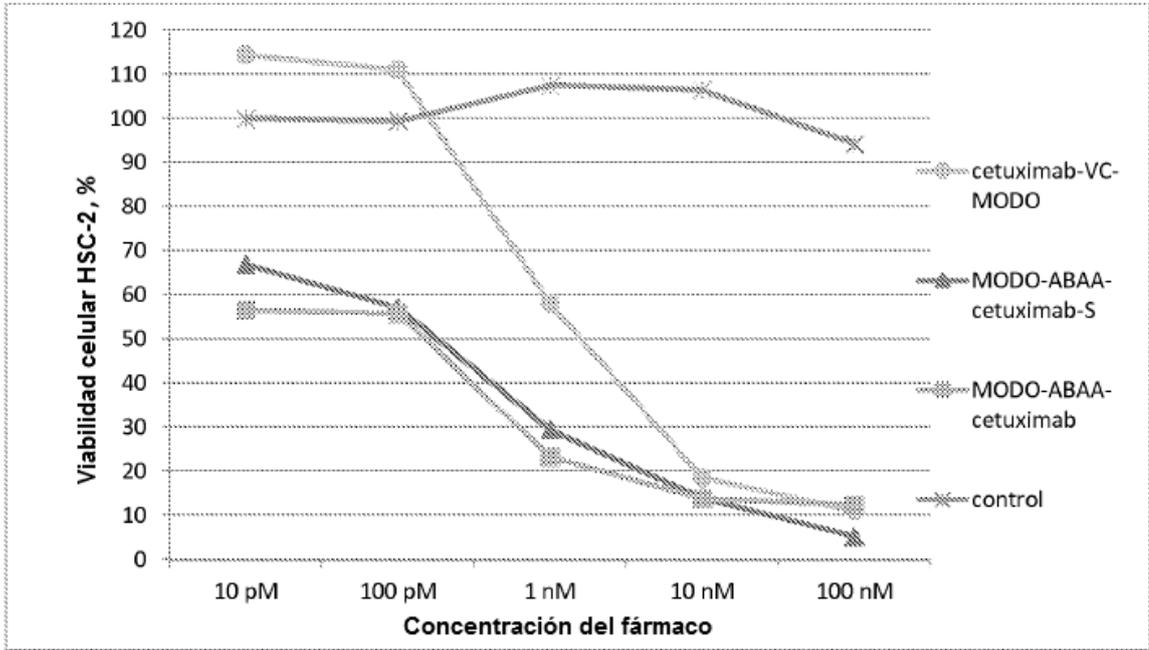


Figura 13

A



B

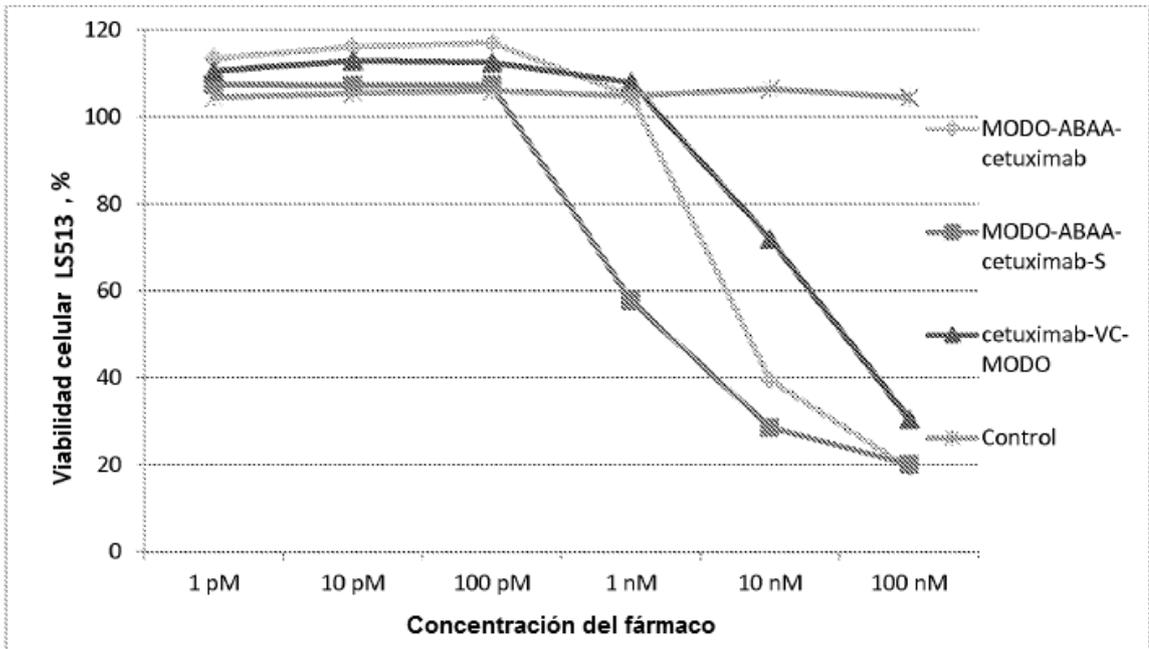


Figura 14