

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N. EP 2 911 699

Richiedente: SynAffix B.V. – Molenstraat 110 - 5342 CC Oss (NL)

Titolo: “ANTICORPO MODIFICATO, CONIUGATO DI ANTICORPO E PROCESSO PER LA PREPARAZIONE DEGLI STESSI”

5

## DESCRIZIONE

### Campo tecnico dell'invenzione

[0001] La presente invenzione si riferisce ad anticorpi modificati, in particolare a anticorpi modificati con uno o più gruppi funzionali di azoturo, alchino e/o chetone. Gli anticorpi modificati in conformità con l'invenzione possono essere coniugati ad una molecola di  
10 interesse, per formare un coniugato di anticorpo. Detta molecola oggetto di interesse può essere per esempio una sostanza attiva. L'invenzione si riferisce perciò anche a coniugati farmaco-anticorpo (ADC). L'invenzione si riferisce ulteriormente ad un metodo per la preparazione degli anticorpi modificati in conformità con l'invenzione, e ad un metodo per la preparazione di un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione.

### 15 Base dell'invenzione

[0002] I coniugati di anticorpo, vale a dire anticorpi coniugati ad una molecola di interesse mediante un linker, sono noti nella tecnica. Esiste un grande interesse nei coniugati di anticorpo in cui la molecola oggetto di interesse è un farmaco, per esempio un prodotto chimico citotossico. I coniugati farmaco anticorpo sono noti nella tecnica, e consistono di  
20 un anticorpo ricombinante legato covalentemente ad un prodotto chimico citotossico mediante un linker sintetico (S.C. Alley et al, Curr. Opin. Chem. Biol. 2010, 14, 529-537). L'obiettivo principale di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC), chiamato anche immunotossina, è di combinare la specificità elevata di un anticorpo monoclonale per un antigene associato al tumore, con la potenza farmacologica di un farmaco citotossico  
25 "piccolo" (tipicamente 300 a 1,000 Da). Esempi di ADC includono gemtuzumab



ozogamicina (Mylotarg; anti-CD33 mAb coniugato a calicheamicina, Pfizer/Wyeth); brentuximab vedotina (SGN-35, Adcetris, un ADC di bersagliamento di CD30 consistente di brentuximab, legato covalentemente a MMAE (monometlauristatina), Seattle Genetics); il coniugato trastuzumab-DM1 (T-DM1).

- 5 **[0003]** Un progresso sul campo include l'emergere di tossine estremamente potenti, in particolari taxani, calicheamicine, maitansine, pirrolobenzodiazepine, duocarmicine e auristatine. La ridotta tossicità da nanomolare a picomolare di queste sostanze rappresenta un miglioramento del conduttore principale sulle tossine applicate precedenti. Un altro progresso tecnologico importante comporta l'uso di linker ottimizzati che sono
- 10 idrolizzabili nel citoplasma, resistenti o suscettibili alle proteasi, o resistenti a pompe di efflusso di resistenza multi-farmaco che sono associate con farmaci altamente citotossici.
- [0004]** ADC noti dalla tecnica anteriore sono comunemente preparati con coniugazione della tossina linker alla catena laterale degli anticorpi di aminoacidi lisina o cisteina, con acilazione o alchilazione, rispettivamente.
- 15 **[0005]** Per le lisine, la coniugazione ha luogo preferenzialmente nelle catene laterali di lisina con maggiore accessibilità sterica, il pKa minimo, o una combinazione degli stessi. Lo svantaggio di questo metodo è il fatto che il controllo di sito di coniugazione è ridotto.
- [0006]** Un controllo migliore della specificità del sito viene ottenuta mediante
- 20 l'alchilazione di cisteine, sulla base del fatto che tipicamente non sono presenti cisteine libere in un anticorpo, offrendo così l'opzione dell'alchilazione soltanto di quelle cisteine che sono selettivamente liberate mediante una fase riduttiva o specificamente ingegnerizzate nell'anticorpo come cisteine libere (come nel cosiddetto Thiomabs). La liberazione di cisteina selettiva mediante riduzione è tipicamente effettuata mediante il
- 25 trattamento dell'anticorpo intero con un agente riducente (per es. TCEP o DTT), che porta alla conversione di un legame di disolfuro in due tioli liberi (per lo più nella regione

cerniera dell'anticorpo). I tioli liberati sono poi alchilati con un reagente elettrofilico, tipicamente basato su una maleimmide attaccata a una tossina linker, che procede generalmente rapido e con elevata selettività. Rispetto all'ingegnerizzazione di una cisteina (libera) addizionale in un anticorpo, l'aumentato controllo del sito è ottenuto in riferimento alla posizione della(e) cisteina(i) aggiunta(e) e non viene richiesta una fase riduttiva, evitando così idealmente clivaggi di legame di disolfuro multipli e alchilazione multipla. Anche in questa strategia, l'alchilazione di cisteine libere è effettuata con la chimica di maleimmide, ma non si ottiene un'omogeneità piena.

[0007] Allo stesso tempo, uno svantaggio di ADC ottenuti per mezzo dell'alchilazione con le maleimmidi è il fatto che in genere i coniugati risultanti sono instabili a causa dell'inverso dell'alchilazione, vale a dire una reazione di retroMichael, portando pertanto al rilascio di una tossina linker dall'anticorpo. Una coniugazione basata sull'alchilazione di maleimmide-cisteina non è chiaramente la tecnologia ideale per gli sviluppi di ADC che preferibilmente non dovrebbero mostrare un rilascio prematuro di tossina.

[0008] È noto nella tecnica che gli azoturi (gruppi  $N_3$ , indicati anche come gruppi azoturi) possono subire una cicloadizione selettiva con alchini terminali (catalizzati con rame) o con alchini ciclici (in virtù del ceppo ad anello). I triazoli risultanti da una reazione con alchini non sono suscettibili di idrolisi o altri percorsi di degradazione. È noto anche nella tecnica il fatto che i chetoni possono subire una coniugazione selettiva con idrossilammine o idrazine, comportando rispettivamente ossime o idrazoni. Ossime e idrazoni sono inoltre relativamente inerti a condizioni neutre ma possono subire idrolisi a pH inferiore.

[0009] Molti metodi per l'introduzione di un azoturo in una proteina sono stati esaminati recentemente da van Delft et al., Chembiochem. 2011, 12,1309: (a) reazione di trasferimento diazoica chemioselettiva, (b) conversione enzimatica, (c) espressione in batteri auxotrofici e (d) codificazione genetica. Le reazioni di trasferimento diazoico

chemioselettivo (a) hanno un'applicabilità limitata per anticorpi poiché queste tipicamente hanno luogo su un termine N della proteina, mentre in un anticorpo i termini N sia della catena pesante che leggera sono nella regione di legame degli anticorpi. L'espressione in batteri auxotrofici (c) e la codificazione genetica (d) sono strategie molto complesse, 5 quantunque potenti, per laboratori non specializzati e inoltre non possono servire ad una post-modificazione semplice di anticorpi ricombinanti esistenti, e non sono perciò generalmente applicabili.

**[0010]** Rispetto alla conversione enzimatica delle proteine (b), molti enzimi sono stati riportati per anni in grado di conseguire tale trasformazione con substrati innaturali 10 contenenti azoturo, per es. transglutaminasi, ligasi di acido lipoico, sortasi, FGE e altri (esaminati in Bertozzi et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48,6974). Senza eccezione, tuttavia, questi enzimi richiedono specifiche sequenze di riconoscimento nella proteina, che devono essere specificamente ingegnerizzate, e la coniugazione può essere limitata ai termini della proteina.

**[0011]** Una strategia potenzialmente versatile che può essere generalmente applicabile a 15 tutti gli anticorpi monoclonali comporta la coniugazione enzimatica specifica al glicano attaccato a Fc, che è naturalmente presente in tutti gli anticorpi espressi nelle colture di cellule di mammifero (o lievito). Molte strategie basate su questo concetto sono note nella tecnica, come ad esempio per mezzo dell'ossidazione del galattosio terminale o per mezzo 20 del trasferimento di acido sialico (innaturale) alla stessa parte di galattosio. Tuttavia, per lo scopo dei ADC tale strategia è subottimale poiché i glicani sono sempre formati come una miscela complessa di isoforme, che può contenere livelli differenti di galattosilazione (G0, G1, G2) e perciò permetterebbe ADC con controllo scarso del rapporto farmaco-anticorpo (DAR, vedasi sotto).

**[0012]** La Figura 1 mostra un anticorpo comprendente un glicano su ciascuna catena 25



pesante. Questi glicani sono presenti in isoforme differenti rispetto alla galattosilazione (G0, G1 e G2) e fucosilazione (G0F, G1F e G2F).

[0013] Nel WO 2007/133855 (University of Maryland Biotechnology Institute)), viene illustrato un metodo chemioenzimatico per la preparazione di una glicoproteina omogenea o glicopeptide, con una strategia a due stadi che comporta prima la rimozione dell'albero di glicano quasi completo (sotto l'azione di un endo A o endo H), lasciando soltanto la parte di N-acetilglucosammina del nucleo (GlcNAc) (la cosiddetta proteina GlcNAc), seguito da un evento di riglicosilazione in cui, in presenza di un catalizzatore comprendente endoglicosidasi (ENGasi), una parte di oligosaccaride è trasferita alla proteina GlcNAc per produrre una glicoproteina o glicopeptide omogeneo. Viene illustrata una strategia per glicoproteine funzionalizzate da azoturo in cui una proteina GlcNAc è fatta reagire in presenza di ENGasi con un'ossazolina di tetrasaccaride, contenente due frazioni di 6-azidomannosio, introducendo pertanto due azoturi simultaneamente nel glicano. La glicoproteina funzionalizzata di azoturo può poi essere fatta reagire cataliticamente in una reazione di cicloadizione a "chimica click", in presenza di un catalizzatore (per es. un catalizzatore Cu(I)) con un alchino terminale che porta una frazione funzionale X di interesse. Non vengono divulgati esempi effettivi della detta chimica click.

[0014] In J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 13790, Wang et al. divulgano un attacco doppio efficiente di un trisaccaride modificato da alchino terminale a ribonucleasi B modificata con bis-azoturo mediante chimica click catalizzata da rame.

[0015] In J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8030, Davis et al. divulgano il trasferimento di ossazoline di oligosaccaride su un dominio di anticorpi intatti nucleo-GlcNAc-Fc fucosilato nel nucleo nonché non fucosilato, in presenza di glicosintasi EndoS.

[0016] In J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308, Wang et al. divulgano il trasferimento di

un'ossazolina di tetrasaccaride contenente due frazioni di 6-azoturomannosio su un dominio di anticorpi intatti nucleo-GlcNAc-Fc fucosilato nel nucleo, come pure non fucosilato (Rituximab) in presenza di glicosintasi mutanti EndoS-D233A e EndoS-D233Q. Questo processo è mostrato schematicamente in figura 2, e comporta un anticorpo  
5 comprendente gruppi di quattro azoturi. La coniugazione successiva di IgG modificato da azoturo con chimica click è menzionata ma non divulgata.

[0017] Tuttavia, uno svantaggio delle strategie di glicosintasi divulgate nel WO 2007/133855, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134,8030 e J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308 è la sintesi complessa e lunga delle ossazoline di oligosaccaride richieste contenenti  
10 azoturo. In aggiunta, le ossazoline di oligosaccaride contenenti azoturo comprendono due gruppi azoturo. Finora, non è stato mostrato se questo processo può essere idoneo per l'introduzione soltanto di un gruppo azoturo su un anticorpo glicano.

[0018] Qasba et al. divulgano in J. Biol. Chem. 2002, 277, 20833, il fatto che le galattosiltransferasi mutanti GalT(Y289L), GalT(Y289I) e GalT(Y289N) possono  
15 attaccare per via enzimatica GalNAc ad uno zucchero non riducente GlcNAc ( $\beta$ -benzil-GlcNAc).

[0019] Il WO 2004/063344 (Nationa Institute of Health), divulga galattosiltransferasi mutanti GalT(Y289L), GalT(Y289I) e GalT(Y289N). Viene illustrato un processo in cui glicani complessi come quelli su anticorpi monoclonali (Rituxan, Remicade, Herceptin)  
20 sono prima convertiti in glicani G0 su anticorpi mediante trattamento con galattosidasi, allo scopo di rimuovere tutto il galattosio terminale della catena. Questi anticorpi G0 sono successivamente sottoposti a GalNAc-UDP in presenza di GalT(Y289L), portando ad anticorpi con strutture di glicano significativamente più omogenee.

[0020] Qasba et al. divulgano in Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1228, il fatto che il  
25 processo divulgato nel WO 2004/063344 procede anche per varianti non naturali GalNAc-



DP sostituite sul gruppo di N-acetile. Gli anticorpi monoclonali trattati con  $\beta$ -galattosidasi aventi una glicofoma G0 sono completamente galattosilati nella glicofoma G2 dopo il trasferimento di una frazione di galattosio comprendente un parte azoturo-acetamido sostituita in C2 (GalNAz) ai residui GlcNAc terminali del glicano, portando ad anticorpi sostituiti in tetraazoturo, vale a dire due frazioni GalNAz per catena pesante.

Questo processo è mostrato schematicamente in figura 3. La coniugazione di detti anticorpi sostituiti in tetraazoturo ad una molecola di interesse non è stata divulgata. Il trasferimento di una parte di galattosio comprendente un gruppo chetone sostituito in C2 (C2-cheto-Gal) ai residui terminali GlcNAc di un glicano di glicofoma G0, nonché il collegamento di C2-cheto-Gal a amminossi biotina, è anch'esso divulgato. In tutti i casi, GalT(Y289L) mutante è usato per il trasferimento di GalNAc-UDP (o GalNAz-UDP) agli anticorpi, ma l'uso di mutanti GalT(Y289N) o GalT(Y289I) non è divulgato.

[0021] Uno svantaggio del metodo divulgato nel WO 2004/063344 e Bioconjugate Chem. 2009, 20,1228 è il fatto che la coniugazione degli anticorpi sostituiti in tetraazoturo ad una molecola di interesse porterebbe ad coniugato di anticorpi tipicamente con due molecole di interesse per glicano (a condizione che detta coniugazione proceda con conversione completa). In alcuni casi, per esempio quando la molecola di interesse è una tossina lipofila, la presenza di troppe molecole di interesse per anticorpo è indesiderata, poiché questo può determinare la formazione di aggregati (BioProcess International 2006, 4,42-43).

[0022] Il WO 2007/095506 e il WO 2008/029281 (Invitrogen Corporation) divulgano un metodo di formazione di un coniugato di glicoproteina in cui la glicoproteina è messa a contatto con UDP-GalNAz in presenza di un mutante GalT(Y289L), portando all'incorporamento di GalNAz in un GlcNAc terminale non riducente di un carboidrato di anticorpo. La chimica click catalizzata da rame successiva con un alchino terminale o

ligazione di Staudinger può poi essere usata per coniugare una molecola reporter, un supporto solido o una molecola veicolo alla frazione di azoturo attaccata. Il WO 2007/095506 e il WO 2008/029281 divulgano ulteriormente il fatto che se nessuno degli zuccheri terminali di GlcNAc sono presenti sull'anticorpo, l'enzima Endo H, Endo A o  
5 Endo M può essere usato per generare una catena troncata che termina con un residuo di N-acetilglucosammina.

**[0023]** I coniugati di anticorpi noti nella tecnica presentano generalmente molti svantaggi. Per coniugati farmaco-anticorpo, una misura per il caricamento dell'anticorpo con una tossina è data dal rapporto farmaco-anticorpo (DAR) [Drug-Antibody Ratio], che fornisce  
10 il numero medio di molecole di sostanza attiva per anticorpo. Tuttavia, il DAR non fornisce indicazioni con riferimento all'omogeneità di tale ADC.

**[0024]** I processi per la preparazione di un coniugato di anticorpo noti dalla tecnica anteriore comportano generalmente un prodotto con un DAR fra 1,5 e 4, ma di fatto tale prodotto comprende una miscela di coniugati di anticorpi con una pluralità di molecole di  
15 interesse, variabile da 0 a 8 o più. In altre parole, i coniugati di anticorpi noti dalla tecnica anteriore generalmente sono formati con un DAR con alta deviazione standard.

**[0025]** Per esempio, gemtuzumab ozogamicina è una miscela eterogenea del 50 % di coniugati (da 0 a 8 frazioni di calicheamicina per molecole IgG con una media di 2 o 3, legate in modo casuale a residui di lisile esposti di solvente dell'anticorpo) e 50 % di  
20 anticorpo non coniugato (Bross et al., Clin. Cancer Res. 2001, 7,1490; Labrijn et al., Nat. Biotechnol. 2009 27,767). Ma anche per brentuximab vedotina, T-DM1, e altro ADC nella clinica, non è ancora controllabile esattamente quanti farmaci si attaccano per ogni dato anticorpo (rapporto farmaco-anticorpo, DAR) e l'ADC viene ottenuto come una distribuzione statistica di coniugati. Se il numero ottimale di farmaci per anticorpo è per  
25 esempio due, quattro o più, il loro attacco in un numero prevedibile e in posizioni

prevedibili attraverso coniugazione specifica del sito con una deviazione standard stretta è ancora problematico.

### **Riassunto dell'invenzione**

[0026] La presente divulgazione si riferisce ad un processo per la preparazione di un anticorpo modificato, comprendente la messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo (GlcNAc), con un composto della formula  $S(A)_x\text{-P}$  in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente  $x$  gruppi funzionali  $A$  in cui  $A$  è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e  $x$  è 1, 2,3 o 4, in cui  $P$  è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), e in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituente GlcNAc- $S(A)_x$  legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituente GlcNAc- $S(A)_x$ . Opzionalmente, la GlcNAc del detto sostituente GlcNAc- $S(A)_x$  è fucosilato.

[0027] La divulgazione si riferisce anche a un anticorpo modificato comprendente un sostituente GlcNAc- $S(A)_x$ , in cui GlcNAc è una N-acetilglucosammina, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente  $x$  gruppi funzionali  $A$  in cui  $A$  è selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e  $x$  è 1, 2,3 o 4, in cui detto sostituente GlcNAc- $S(A)_x$  è legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituente GlcNAc- $S(A)_x$ , e in cui detta N-acetilglucosammina è opzionalmente fucosilata.

[0028] La divulgazione si riferisce anche a un processo per la preparazione di un coniugato

di anticorpo, comprendente la reazione dell'anticorpo modificato in conformità con l'invenzione con un coniugato di linker, in cui detto coniugato di linker comprende un gruppo funzionale B e uno o più molecole di interesse, in cui detto gruppo funzionale B è un gruppo funzionale che è in grado di reagire con un gruppo funzionale A di un  
5 sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> sul detto anticorpo modificato.

**[0029]** L'invenzione si riferisce ad un processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo, comprendente la reazione dell'anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui detto anticorpo modificato è un anticorpo comprendente un sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, in cui GlcNAc è una N-acetilglucosammina, in cui S(A)<sub>x</sub> è un derivato di zucchero  
10 comprendente x gruppi funzionali A in cui A è un gruppo azoturo e x è 1, 2,3 o 4, in cui detto sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detto GlcNAc è opzionalmente fucosilato e in cui detto coniugato di linker comprende un gruppo di (etero)cicloalchinile o un gruppo di alchinile terminale e una o più molecole di interesse.

**[0030]** L'invenzione si riferisce inoltre a un coniugato di anticorpo ottenibile mediante il processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione.

**[0031]** L'anticorpo modificato qui divulgato, e il coniugato di anticorpo e i processi per la preparazione degli stessi in conformità con l'invenzione hanno numerosi vantaggi rispetto ai processi, anticorpi modificati e coniugati di anticorpi noti nella tecnica.

**[0032]** Come è stato descritto sopra, i processi noti per la coniugazione di entità di tossina linker agli anticorpi devono ancora essere migliorati, in termini di controllo sia della specificità di sito che della stechiometria. Malgrado la capacità di ADC di stabilirsi sui loro bersagli, la quantità di farmaco stimata penetrare nelle cellule tumorali è tipicamente <2 % di una dose somministrata. Questo problema è amplificato dai risultati di  
25 coniugazione imprevedibili degli ADC noti nella tecnica. E' importante evitare anticorpi



sottoconiugati, che diminuiscono la potenza, come pure specie altamente coniugate, che possono avere emivite di circolazione marcatamente diminuite, legame compromesso alla proteina bersaglio, e tossicità aumentata.

[0033] Per coniugati anticorpo-farmaco, una misura per il caricamento delle molecole di interesse (per es. farmaci, sostanze attive) sull'anticorpo è il cosiddetto rapporto del farmaco rispetto all'anticorpo (DAR), che fornisce il numero medio di molecole di sostanza attiva per anticorpo, calcolato a partire da una distribuzione statistica. Il valore massimo teorico del DAR per un certo tipo di ADC è uguale al numero di siti di ancoraggio. Come è stato descritto sopra, i processi per la preparazione di ADC noti dalla tecnica anteriore comportano generalmente un prodotto comprendente una miscela di coniugati di anticorpi con un numero variabile di molecole di interesse presenti in ciascun coniugato di anticorpo, e in un DAR con una deviazione standard elevata.

[0034] Uno dei vantaggi degli anticorpi modificati e i coniugati di anticorpi in conformità con l'invenzione è che questi anticorpi e coniugati di anticorpi sono omogenei, sia nella specificità di sito che nella stechiometria. Detti anticorpi modificati e coniugati di anticorpi sono ottenuti con un DAR molto vicino al valore teorico, e con una deviazione standard molto bassa. Questo significa anche che i coniugati di anticorpi in conformità con l'invenzione hanno comportato un prodotto più costante per i test preclinici.

[0035] In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo modificato e coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione sono omogenei, sia nella specificità di sito che nella stechiometria. Qui, un anticorpo o un coniugato di anticorpo è considerato omogeneo quando la coniugazione è effettuata soltanto in un sito predeterminato e con rapporto di farmaco-anticorpo predeterminato. Un coniugato di anticorpo è eterogeneo quando la coniugazione dell'anticorpo ha luogo in siti differenti nell'anticorpo, portando a una miscela di prodotti con rapporto di farmaco-anticorpo imprevedibile. Nell'ultimo caso, il

rapporto farmaco-anticorpo sarà una media del gruppo intero di coniugati farmaco-anticorpo.

**[0036]** In un'altra forma di realizzazione preferita, il coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione ha un DAR che si trova entro il 10 % del suo valore teorico.

5 **[0037]** Un altro vantaggio dei processi e anticorpi in conformità con l'invenzione comporta la riduzione di rifiuti di fabbricazione, così aumentando il costo dei prodotti delle aziende.

**[0038]** Inoltre, quando un anticorpo modificato da azoturo in conformità con l'invenzione è accoppiato a un coniugato di linker comprendente un gruppo alchinile, o quando un anticorpo modificato da alchino in conformità con l'invenzione è accoppiato ad un  
10 coniugato di linker comprendente una frazione di azoturo, mediante una reazione di cicloaddizione, i triazoli risultanti non sono suscettibili di idrolisi o altri percorsi di degradazione. Quando un anticorpo modificato da chetone in conformità con l'invenzione è accoppiato a un coniugato di linker comprendente un'idrossilammina o un'idrazina, le ossime o idrazoni risultanti sono inoltre relativamente inerti a condizioni neutre.

15 **[0039]** I vantaggi addizionali sono così la stabilità di coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione, come pure il processo semplice e generalmente applicabile per l'introduzione di un gruppo azoturo, un gruppo chetone o un gruppo alchinile in un anticorpo.

**[0040]** Come è stato descritto sopra, la coniugazione enzimatica di uno zucchero innaturale al GlcNAc terminale di un glicano oligomerico attaccato ad un anticorpo, in  
20 presenza della galattosiltransferasi Y289L mutante, come è stato mostrato in figura 3, è nota nella tecnica.

**[0041]** Finora, tuttavia, l'idoneità di galattosiltransferasi mutanti note nella tecnica per il trasferimento di nucleotidi di zucchero o nucleotidi di derivati di zucchero di un sostituente  
25 nucleo-GlcNA su un anticorpo, e l'idoneità di tale strategia per la generazione di coniugati

di anticorpi, non erano state ancora dimostrate. Nei processi noti nella tecnica anteriore, un nucleotide di zucchero o nucleotide di derivato dello zucchero è trasferito a un GlcNAc terminale di un glicano oligosaccaride o polisaccaride legato ad un anticorpo.

[0042] In aggiunta, finora l'idoneità di galattosiltransferasi mutanti note nella tecnica per  
5 il trasferimento di nucleotidi di zucchero o nucleotidi di derivati di zucchero di zuccheri interni e derivati di zucchero non era stata dimostrata. Con i processi in conformità con l'invenzione, è ora possibile trasferire un derivato di zucchero comprendente gruppi funzionali come uno o più gruppi azoturo, chetonici e/o alchino, ad un sostituito GlcNAc del nucleo presente su un anticorpo, a prescindere dal fatto se detto GlcNAc è fucosilato  
10 o meno. Vantaggiosamente, la rimozione di fucosio prima del processo in conformità con l'invenzione non è perciò necessaria, poiché può essere usata nel processo una miscela di anticorpi comprendente entrambi i sostituenti GlcNAc del nucleo e GlcNAc(Fuc) del nucleo.

#### **Descrizione delle figure**

15 [0043]

La Figura 1 mostra differenti glicoforme di glicani di anticorpi G2F, G1F, G0F, G2, G1 e G0.

La Figura 2 mostra un processo per il trasferimento di un tetrasaccaride comprendente due gruppi azoturo di un sostituito di GlcNAc del nucleo in presenza di EndoS-D233A  
20 mutante, che comporta un anticorpo modificato comprendente quattro gruppi azoturo, come divulgato in J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308.

La Figura 3 mostra un processo per il trasferimento di GalNAz ai residui GlcNAc terminali di un glicano di anticorpo, che porta ad un anticorpo modificato comprendente quattro gruppi azoturo, come divulgato in Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1228.

25 La Figura 4 mostra una forma di realizzazione preferita del processo per la preparazione

di un anticorpo modificato da azoturo, in cui un anticorpo opzionalmente sostituito comprendente un sostituente GlcNAc del nucleo è fatto reagire con GalNAz-UDP in presenza di GalT Y289L come catalizzatore.

La Figura 5 mostra la deglicosilazione di una miscela di glicoforme in presenza di EndoS  
5 come catalizzatore.

La Figura 6 mostra una forma di realizzazione preferita del processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo, in cui un anticorpo modificato da azoturo è coniugato ad un coniugato di linker comprendente una o più molecole di interesse.

La Figura 7 mostra lo schema di reazione della sintesi di coniugati BCN-doxorubicina  
10 linker non clivabili **28a** e **28b**.

La Figura 8 mostra lo schema di reazione per la sintesi di coniugato DIBAC-biotina **30**.

La Figura 9 mostra lo schema di reazione della sintesi di coniugato di BCN-vc-PABA-doxorubicina **33** linker clivabile a partire da Fmoc-citrullina **31**.

La Figura 10a mostra lo schema di reazione per la sintesi di coniugati di BCN clivabili a  
15 vc-PABA-MMAE (**37a**), vc-PABA-MMAF (**37b**), coniugato BCN-MMAF non clivabile (**38**), coniugato BCN-vc-PABA-maitansinoide clivabile (**38**) e coniugato maleimmide-vc-PABA-maitansinoide (**40**).

La Figura 10b mostra la struttura di un coniugato BCN-MMAF non clivabile **57**.

La Figura 11 mostra lo schema di reazione per la sintesi di DIBAC-vc-PABA-MMAF  
20 clivabile **41**.

La Figura 12 mostra lo schema di reazione per la sintesi di tre coniugati di cicloottinodoxorubicina **42-44**.

La Figura 13 mostra le strutture di tre reagenti biotinilanti funzionalizzati **45-47**.

La Figura 14 mostra lo schema di reazione per la sintesi di derivati UDP-GalNAc 2-  
25 modificati **52-54** e le strutture UDP-Gal modificate da 6-azoturo (**55**) e UDP-GalNAc (**56**).

La Figura 15 mostra il profilo MS di (A) trastuzumab, (B) trastuzumab dopo la rimozione con endo S, (C) dopo galattosiltransferasi con UDP-GalNAz **52** e (D) dopo coniugazione con BCN-MMAF **37b**.

La Figura 16 mostra il profilo MS di IgG del plasma combinato in pool (A), dopo la rimozione con endo S (B) e dopo galattosiltransferasi con UDP-GalNAz **52** (C).

La Figura 17 mostra il profilo MS di trastuzumab tagliato con endo S, poi galattosiltransferasi con UDP-GalNAz **52** e infine mediante coniugazione catalizzata con rame con alchino-biotina **45**.

La Figura 18 mostra il profilo MS di trastuzumab tagliato con endo S, (A) dopo galattosiltransferasi con UDP-GalNAc-ina **53** e (B) dopo la coniugazione catalizzata da rame con azoturo-biotina **46**, che porta ad una conversione del 50%.

La Figura 19 mostra il profilo MS di trastuzumab rimosso con endo S, (A) dopo galattosiltransferasi con UDP-GalNLev **55** e (B) dopo coniugazione di ossima con idrossilammina-biotina **47**.

La Figura 20 mostra SDS-PAGE in condizioni riducenti (corsia 1-4) o condizioni non riducenti (corsia 5-8) di trastuzumab (corsia 1 e 5), trastuzumab dopo la rimozione e galattosiltransferasi con UDP-GalNAz **52** (corsia 2 e 6), coniugato di trastuzumab ottenuto mediante il trattamento di trast(GalNAz)<sub>2</sub> con BCN-biotina **25** (corsia 3 e 7) e il coniugato di trastuzumab ottenuto mediante il trattamento di trast(GalNAz)<sub>2</sub> con alchino-biotina **45** su reazione click catalizzata da Cu(I)- (corsia 4 e 8). Molte bande nella corsia 4 e 8 indicano la formazione di frammenti covalenti e/o ridotti formati, come pure l'aggregazione, risultante dalla coniugazione click catalizzata da rame, che sono tutti assenti dalla coniugazione promossa dal ceppo nella corsia 3 e 7.

La Figura 21 mostra il cromatogramma ad esclusione di dimensione di un coniugato di trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub> derivato da trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> e BCN-MMAF **37b**.

La Figura 22 mostra il profilo MS dipendente dal tempo di trastuzumab(doxorubicina)<sub>2</sub> derivato da **28a**, nel plasma umano con deplezione di IgG.

La Figura 23 mostra il livello di aggregazione di differenti mAb o ADC non trattati o 5 cicli di congelamento - scongelamento.

5 La Figura 24 mostra la citotossicità *in vitro* di un range di ADC su una linea cellulare SK-BR-3.

La Figura 25 mostra la citotossicità *in vitro* di un range di ADC su una linea cellulare SK-OV-3.

La Figura 26 mostra la citotossicità *in vitro* di un range di ADC su una linea cellulare  
10 MDA-MB-231 (controllo).

La Figura 27 mostra la clearance del sangue di trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub> marcato con <sup>111</sup>In derivato da **37b**, trastuzumab(maitansinoide)<sub>2</sub> derivato da **39**, trastuzumab deglicosilato (ottenuto mediante rimozione con endo S di trastuzumab) e trastuzumab nativo.

La Figura 28 mostra la biodistribuzione di trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub> marcato con <sup>111</sup>In  
15 derivato da **37b**, trastuzumab(maitansinoide)<sub>2</sub> derivato da **39**, trastuzumab deglicosilato (ottenuto mediante rimozione con endo S di trastuzumab) e trastuzumab nativo. Ai topi sono stati iniettati 25 µg e sono stati sezionati 21 g post-iniezione. L'assorbimento del tessuto è espresso come % DI/g.

La Figura 29 mostra l'efficacia *in vivo* di un modello di xenotrapianto di topo. Gli ADC  
20 che sono stati valutati erano trastuzumab coniugato con N29 a vc-maitansinoid (3 mg/kg e 9 mg/kg) e comparati al T-DMI (9 mg/kg).

Un modello di xenotrapianto derivato dal paziente con cancro (PDX) è stato scelto mediante impianto sottocutaneo di codice tumorale (HBx-13B) in topi femmina SHO.

I tumori sono stati misurati il giorno 0, 4, 7, 11 e 14.

25 La Figura 30 mostra l'efficacia *in vivo* di un modello di xenotrapianto di topo. Gli ADC

che sono stati valutati erano trastuzumab coniugato con N297 a vc-maitansinoide (3 mg/kg e 9 mg/kg), trastuzumab coniugato con N297 a vc-MMAF (3 mg/kg e 9 mg/kg) e comparato al T-DM1 (9 mg/kg). Un modello di xenotrapianto derivato da paziente con cancro (PDX) è stato scelto mediante impianto sottocutaneo del codice tumorale (HBx-  
5 13B) in topi femmina SHO. I tumori sono stati misurati il giorno 0, 4, 7, 11, 14, 18 e 21 per ADC di vc-maitansinoide, T-DM1 e veicolo e il giorno 0, 3, 7 e 10.

La Figura 31 mostra l'analisi dettagliata di analisi degli spettri di massa di specie di proteina intatta (nanoLC-MS) usando nanoIC accoppiato QTOF MS a risoluzione ultra elevata (maxi 4G) della catena leggera (LC) di (A) trastuzumab nativo, (B)  
10 trast(GalNAz)<sub>2</sub>, (C) trast(GalNAz)<sub>2</sub> dopo coniugazione con BCN-biotina **25** e (D) trast(GalNAz)<sub>2</sub> dopo coniugazione catalizzata da rame con alchino-biotina **45**. Mentre il picco di base è identico per (A)-(C), il coniugato di trastuzumab formato con catalisi di rame (D) mostra uno spallamento chiaro a 23441,5 e un altro uno a 23459,5, che indica la formazione di quantità significative (>20 %) di ossidato e/o prodotti secondari deamidati.

## 15 **Descrizione dettagliata dell'invenzione**

### *Definizioni*

[0044] Il verbo "comprendere" secondo l'uso questa descrizione e nelle rivendicazioni e le sue coniugazioni è usato nel suo senso non limitativo per intendere che gli elementi a seguito della parola sono inclusi, ma elementi non specificamente menzionati non sono  
20 esclusi.

[0045] In aggiunta, il riferimento ad un elemento mediante l'articolo indefinito "un" o "una" non esclude la possibilità che più di uno degli elementi sia presente, a meno che il contesto chiaramente richieda che vi sia uno e soltanto uno degli elementi. L'articolo indefinito "un" o "una" significa così usualmente "almeno uno".

25 [0046] I composti divulgati in questa descrizione e nelle rivendicazioni possono

- comprendere uno o più centri asimmetrici, e possono esistere diastereomeri e/o enantiomeri differenti dei composti. La descrizione di un qualsiasi composto in questa descrizione e nelle rivendicazioni è intesa includere tutti i diastereomeri, e miscele degli stessi, a meno che non si affermi altrimenti. In aggiunta, la descrizione di un qualsiasi
- 5 composto in questa descrizione e nelle rivendicazioni è intesa includere sia gli enantiomeri individuali, come pure qualsiasi miscela, racemica o diversa, degli enantiomeri, a meno che non si affermi altrimenti. Quando la struttura di un composto è illustrata come un enantiomero specifico, si deve intendere che l'invenzione della presente domanda non è limitata a quell'enantiomero specifico.
- 10 **[0047]** I composti potrebbero ricorrere nelle forme tautomeriche differenti. I composti in conformità con l'invenzione sono intesi includere tutte le forme tautomeriche, a meno che non si affermi altrimenti. Quando la struttura di un composto è descritta come un composto tautomerico specifico, si deve intendere che l'invenzione della presente domanda non è limitata a quel composto tautomero specifico.
- 15 **[0048]** I composti divulgati in questa descrizione e nelle rivendicazioni possono ulteriormente esistere in forma di endo e eso diastereoisomeri. A meno che non si affermi altrimenti, la descrizione di un qualsiasi composto nella descrizione e nelle rivendicazioni è intesa includere sia eso diastereoisomeri individuali che endo diastereoisomeri individuali di un composto, come pure miscele degli stessi. Quando la struttura di un composto è
- 20 descritta come un eso o endo diastereomero specifico, si deve intendere che l'invenzione della presente domanda non è limitata a quel eso o endo diastereomero specifico.
- [0049]** Inoltre, i composti divulgati in questa descrizione e nelle rivendicazioni possono esistere in forma di isomeri trans e cis. A meno che non si affermi altrimenti, la descrizione di qualsiasi composto nella descrizione e nelle rivendicazioni è intesa includere sia
- 25 l'isomero cis individuale sia l'isomero trans individuale di un composto, come pure

miscele degli stessi. A titolo di esempio, quando la struttura di un composto è descritta come un isomero cis, si deve intendere che l'isomero trans corrispondente o miscela dell'isomero trans e cis non sono escluse dall'invenzione della presente domanda. Quando la struttura di un composto è illustrata come un isomero trans o cis specifico, si deve intendere che l'invenzione della presente domanda non è limitata a quell'isomero trans o cis specifico.

**[0050]** I composti divulgati in questa descrizione e nelle rivendicazioni possono ulteriormente esistere sotto forma di regioisomeri. A meno che non si affermi altrimenti, la descrizione di qualsiasi composto nella descrizione e nelle rivendicazioni è intesa includere entrambi i regioisomeri di un composto, come pure miscele degli stessi. Quando la struttura di un composto è illustrata come un regioisomero specifico, si deve intendere che l'invenzione della presente domanda non è limitata a quel regioisomero specifico.

**[0051]** I gruppi alchile non sostituiti hanno la formula generale  $C_nH_{2n+1}$  e possono essere lineari o ramificati. I gruppi alchile non sostituiti possono anche contenere una frazione ciclica, e hanno così la formula generale concomitante  $C_nH_{2n-1}$ . Opzionalmente, i gruppi alchile sono sostituiti da uno o più sostituenti ulteriormente specificati in questo documento. Esempi di gruppi alchilici includono metile, etile, propile, 2-propile, t-butile, 1-esile, 1-dodecile, ecc.

**[0052]** Un gruppo arile comprende da sei a dodici atomi di carbonio e può includere strutture bicicliche e monocicliche. Opzionalmente, il gruppo arile può essere sostituito da uno o più sostituenti ulteriormente specificati in questo documento. Esempi di gruppi arile sono fenile e naftile.

**[0053]** Un gruppo eteroarile comprende da cinque a dodici atomi di carbonio in cui da uno a quattro atomi di carbonio sono sostituiti da eteroatomi selezionati dal gruppo consistente

di ossigeno, azoto, fosforo e zolfo. Un gruppo eteroarile può avere una struttura monociclica o biciclica. Opzionalmente, il gruppo eteroarile può essere sostituito da uno o più sostituenti ulteriormente specificati in questo documento. Esempi di gruppi eteroarilici idonei includono piridinile, chinolinile, pirimidinile, pirazinile, pirazolile, pirrolile, furanile, benzofuranile, indolile, purinile, benzossazolile, fosfolile tienile e ossazolile.

**[0054]** Gruppi arilalchile e gruppi alchilarile comprendono almeno sette atomi di carbonio e possono includere strutture bicicliche e monocicliche. Opzionalmente, i gruppi arilalchile e alchilarile possono essere sostituiti da uno o più sostituenti ulteriormente specificati in questo documento. Un gruppo arilalchile è per esempio il benzile. Un gruppo alchilarile è per esempio 4-t-butilfenile.

**[0055]** Un gruppo alchinile comprende uno o più legami tripli carbonio-carbonio. Un gruppo alchinile non sostituito comprendente un triplo legame ha la formula generale  $C_nH_{2n-3}$ . Un alchinile terminale è un gruppo alchinile in cui il legame triplo è situato in una posizione terminale del gruppo alchinile. Opzionalmente, il gruppo alchinile è sostituito da uno o più sostituenti ulteriormente specificati in questo documento, e/o interrotto da eteroatomi selezionati dal gruppo di ossigeno, azoto e zolfo. Esempi di gruppi alchinile includono etinile, propinile, butinile, ottinile, ecc.

**[0056]** Un gruppo cicloalchinile è un gruppo alchinile ciclico. Un gruppo cicloalchinile non sostituito comprendente un legame triplo ha la formula generale  $C_nH_{2n-5}$ . Opzionalmente, un gruppo cicloalchinile è sostituito da uno o più sostituenti ulteriormente specificati in questo documento. Un esempio di un gruppo cicloalchinile è il cicloottinile.

**[0057]** Un gruppo eterocicloalchinile è un gruppo cicloalchinile interrotto da eteroatomi selezionati dal gruppo di ossigeno, azoto e zolfo. Opzionalmente, un gruppo eterocicloalchinile è sostituito da uno o più sostituenti ulteriormente specificati in questo

documento. Un esempio di un gruppo eterocicloalchinile è azacicloottinile.

**[0058]** Un gruppo (etero)arile comprende un gruppo arile e un gruppo eteroarile. Un gruppo alchil(etero)arile comprende un gruppo alchilarile e un gruppo alchileteroarile.

Un gruppo (etero)arilalchile comprende un gruppo arilalchile e un gruppo eteroarilalchile.

5 Un gruppo (etero)alchinile comprende un gruppo alchinile e un gruppo eteroalchinile. Un gruppo (etero)cicloalchinile comprende un gruppo cicloalchinile e un gruppo eterocicloalchinile.

**[0059]** Un composto (etero)cicloalchino è qui definito come un composto comprendente un gruppo di (etero)cicloalchinile.

10 **[0060]** Molti composti divulgati in questa descrizione e nelle rivendicazioni possono essere descritti come composti di (etero)cicloalchino fusi, vale a dire composti di (etero)cicloalchino in cui una seconda struttura ad anello è fusa, vale a dire che è stata aggiunta con un anello, al gruppo (etero)cicloalchinile. Per esempio, in un composto di (etero)cicloottino fuso, un cicloalchile (per es. unciclopropile) o un arene (per es. benzene)  
15 può essere stato aggiunto con anello al gruppo (etero)cicloottinile. Il triplo legame del gruppo (etero)cicloottinile in un composto di (etero)cicloottino fuso può essere situato in una di tre possibili posizioni, vale a dire alla posizione 2, 3 o 4 della parte di cicloottino (numerazione in conformità a "IUPAC Nomenclature of Organic Chemistry", regola A31.2). La descrizione di qualsiasi composto di (etero)cicloottino fuso in questa  
20 descrizione e nelle rivendicazioni è intesa includere tutti e tre i regioisomeri individuali della parte di cicloottino.

**[0061]** Quando un gruppo alcile, un gruppo (etero)arile, un gruppo alchil(etero)arile, un gruppo (etero)arilalchile, un gruppo (etero)cicloalchinile è opzionalmente sostituito, detti gruppi sono indipendentemente opzionalmente sostituiti con uno o più sostituenti  
25 indipendentemente selezionati dal gruppo consistente di gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi

alchenile C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alchinile C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi cicloalchile C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alcossi C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alchenilossi C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alchinilossi C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi cicloalchilossi C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, alogeni, gruppi amminici, gruppi oxo e gruppi silile, in cui i gruppi achile, gruppi alchenile, i gruppi alchinile, gruppi cicloalchile, gruppi alcossi, gruppi alchenilossi, gruppi alchinilossi e i gruppi cicloalchilossi sono opzionalmente sostituiti, i gruppi alchile, gli gruppi alcossi, i gruppi cicloalchile e i gruppi cicloalcossi essendo opzionalmente interrotti da uno di più eteroatomi selezionati dal gruppo consistente di O, N e S, in cui i gruppi silile sono rappresentati dalla formula (R<sup>6</sup>)<sub>3</sub>Si-, in cui R<sup>6</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alchenile C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alchinile C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi cicloalchile C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alcossi C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alchenilossi C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub>, gruppi alchinilossi C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub> e gruppi cicloalchilossi C<sub>3</sub> - C<sub>12</sub>, in cui i gruppi alchile, i gruppi alchenile, i gruppi alchinile, i gruppi cicloalchile, i gruppi alcossi, i gruppi alchenilossi, i gruppi alchinilossi e i gruppi cicloalchilossi sono opzionalmente sostituiti, i gruppi alchile, i gruppi alcossi, i gruppi cicloalchile e i gruppi cicloalcossi essendo opzionalmente interrotti da uno di più eteroatomi selezionati dal gruppo consistente di O, N e S.

**[0062]** Un anticorpo è una proteina generata dal sistema immunitario che è in grado di riconoscere e legare ad un antigene specifico. Il termine anticorpo è usato qui nel suo senso più ampio e include specificamente anticorpi monoclonali, anticorpi policlonali, dimeri, multimeri, anticorpi multispecifici (per es. anticorpi bispecifici), frammenti di anticorpo, e anticorpi a catena singola e doppia. Il termine "anticorpo" è inteso qui includere anticorpi di essere umano, anticorpi umanizzati, anticorpi chimerici e anticorpi che legano l'antigene del cancro. Il termine "anticorpo" è inteso includere anticorpi interi, ma anche frammenti di un anticorpo, per esempio un frammento Fab di anticorpo, F(ab')<sub>2</sub>, un frammento Fv o un frammento Fc da un anticorpo clivato, un frammento scFv-Fc, un

minicorpo, un diacorpo o un scFv. Inoltre, il termine include derivati geneticamente modificati di un anticorpi. Gli anticorpi, frammenti di anticorpi e anticorpi geneticamente modificati possono essere ottenuti mediante metodi che sono noti nella tecnica. Gli anticorpi commercializzati idonei includono, tra gli altri, abciximab, rituximab, basiliximab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, alemtuzumab, adalimumab, 5 tositumomab-I131, cetuximab, ibrituximab tiuxetan, omalizumab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, panitumumab, eculizumab, certolizumab pegol, golimumab, canakinumab, catumaxomab, ustekinumab, tocilizumab, ofatumumab, denosumab, belimumab, ipilimumab e brentuximab.

10 **[0063]** Il termine generale "zucchero" è usato qui per indicare un monosaccaride, per esempio glucosio (Glc), galattosio (Gal), mannosio (Man) e fucosio (Fuc). L'espressione "derivato di zucchero" è qui usata per indicare un derivato di uno zucchero di monosaccaride, vale a dire uno zucchero di monosaccaride comprendente sostituenti e/o gruppi funzionali. Gli esempi di un derivato di zucchero includono zuccheri amminici e 15 acidi di zucchero, per es. glucosammina (GlcN), galattosammina (GalN) N-acetilglucosammina (GlcNAc), N-acetilgalattosammina (GalNAc), acido N-acetilneuraminico (NeuNAc) e acido N-acetilmuramico (MurNAc), acido glucuronico (GlcA) e acido iduronico (IdoA). Gli esempi di un derivato di zucchero includono anche composti qui indicati S(A)<sub>x</sub>, in cui S è uno zucchero o un derivato dello zucchero, e in cui 20 S comprende x gruppi funzionali A.

**[0064]** Un sostituente N-acetilglucosammina del nucleo (sostituente GlcNAc del nucleo) è qui definito come un GlcNAc che è legato per mezzo di C1 ad un anticorpo, preferibilmente per mezzo di un legame N-glicosidico all'atomo di azoto amide nella catena laterale di un aminoacido di asparagina dell'anticorpo. Il sostituente GlcNAc del 25 nucleo può essere presente in un sito di glicosilazione nativo di un anticorpo, ma questo

può anche essere introdotto su un sito differente sull'anticorpo. Qui, un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è un sostituito di monosaccaride, o se detto sostituito di GlcNAc del nucleo è fucosilato, un sostituito (Fuc $\alpha$ 1-6)GlcNAc del nucleo di disaccaride, ulteriormente indicato come GlcNAc(Fuc). Qui, un "sostituito GlcNAc del nucleo" non deve essere confuso con un "GlcNAc del nucleo". Un GlcNAc del nucleo è qui definito come GlcNAc interno che è parte di un polioliigosaccaride o oligosaccaride comprendente più di due saccaridi, vale a dire la GlcNAc per mezzo del quale il polisaccaride o oligosaccaride è legato ad un anticorpo.

[0065] Un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo come definito qui è così un anticorpo, comprendente un sostituito GlcNAc del nucleo del monosaccaride come definito sopra, o se detto sostituito di GlcNAc del nucleo è fucosilato, un sostituito di disaccaride di GlcNAc(Fuc) del nucleo.

[0066] Se un sostituito di GlcNAc del nucleo o la GlcNAc in un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> viene fucosilato, il fucosio è più comunemente  $\alpha$ -1,6 legato a C6 del sostituito di GlcNAc del nucleo. Un sostituito di GlcNAc del nucleo fucosilato è indicato come GlcNAc(Fuc) del nucleo, un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> fucosilato è indicato GlcNAc(Fuc)-S(A)<sub>x</sub>.

[0067] I termini "trattamento," "trattare" e simili si riferiscono all'ottenimento di un effetto farmacologico e/o fisiologico desiderato. L'effetto può essere profilattico in termini di prevenzione completa o parziale di una malattia o un sintomo della stessa e/o può essere terapeutico in termini di una cura completa o parziale per una malattia e/o effetto nocivo attribuibile alla malattia. Il "trattamento," secondo l'uso qui, comprende qualsiasi trattamento di una malattia in un mammifero, in particolare in un essere umano, e include la prevenzione del ricorrere della malattia in un soggetto che può essere predisposto alla malattia ma a cui essa non è stata ancora diagnosticata; l'inibizione della malattia, vale a



dire, l'arresto del suo sviluppo; l'alleviamento della malattia, vale a dire, provocare la regressione della malattia.

***Processo per la preparazione di un anticorpo modificato***

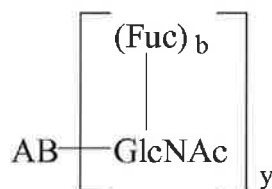
[0068] La presente divulgazione si riferisce ad un processo per la preparazione di un anticorpo modificato, comprendente la messa a contatto di un anticorpo comprendente un  
5 sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo (un sostituente di GlcNAc del nucleo) con un composto della formula  $S(A)_x$ -P in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto sostituente di GlcNAc del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un  
10 derivato dello zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), e in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituente di  
15 GlcNAc- $S(A)_x$  legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituente GlcNAc- $S(A)_x$ .

[0069] In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo comprendente un sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo (sostituente di GlcNAc del nucleo) è un anticorpo monoclonale (mAb). Preferibilmente, detto anticorpo è selezionato dal gruppo consistente  
20 di anticorpi IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Più preferibilmente, detto anticorpo è un anticorpo IgG, e in maniera maggiormente preferibile detto anticorpo è un anticorpo IgG1. Quando detto anticorpo è un anticorpo intero, l'anticorpo comprende preferibilmente uno o più, più preferibilmente un sostituente di GlcNAc del nucleo su ciascuna catena pesante, detto sostituente di GlcNAc del nucleo essendo opzionalmente fucosilato. Detto anticorpo  
25 intero comprende così preferibilmente due o più, preferibilmente due, sostituenti di

GlcNAc del nucleo opzionalmente fucosilati. Quando detto anticorpo è un anticorpo a catena singola o un frammento di anticorpo, per es. un frammento Fab, l'anticorpo comprende preferibilmente uno o più sostituenti di GlcNAc del nucleo, che è opzionalmente fucosilato.

5 **[0070]** Nell'anticorpo comprendente un sostituente di GlcNAc del nucleo (vale a dire il materiale di partenza del processo), detto sostituente di GlcNAc del nucleo può essere situato ovunque sull'anticorpo, a condizione che detto sostituente non ostacoli il sito di legame dell'antigene dell'anticorpo. In una forma di realizzazione, detto sostituente di GlcNAc del nucleo è situato nel frammento Fc dell'anticorpo, più preferibilmente nel  
10 dominio C<sub>H</sub>2. In un'altra forma di realizzazione, detto sostituente di GlcNAc del nucleo è situato sul frammento Fab dell'anticorpo.

**[0071]** In una forma di realizzazione, l'anticorpo comprendente un sostituente di GlcNAc del nucleo, in cui detto sostituente di GlcNAc del nucleo è opzionalmente fucosilato, ha la Formula (1), in cui AB rappresenta un anticorpo, GlcNAc è N-acetilglucosammina, Fuc  
15 è fucosio, b è 0 o 1 e y è da 1 a 20.



20

**1**

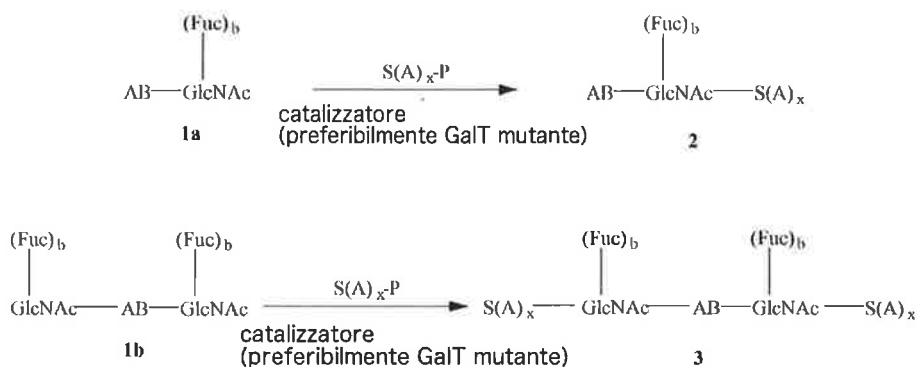
**[0072]** In una forma di realizzazione preferita, y è da 1 a 10, più preferibilmente y è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, ancor più preferibilmente y è 1, 2, 3 o 4 e in maniera maggiormente preferibile y è 1 o 2.

**[0073]** Una forma di realizzazione del processo in conformità con l'invenzione in cui il  
25 materiale di partenza del processo è un anticorpo comprendente un sostituente di GlcNAc



del nucleo opzionalmente fucosilato (**1a**,  $y$  è 1) e una forma di realizzazione in cui detto materiale di partenza è un anticorpo comprendente due sostituenti di GlcNAc del nucleo opzionalmente fucosilati (**1b**,  $y$  è 2) sono mostrate nello schema 1, in cui AB rappresenta un anticorpo e in cui  $b$  è 0 o 1.  $S(A)_x$  e P sono come definiti sopra.

- 5 **[0074]** Una modificazione di anticorpo (**1a**) conduce ad un anticorpo modificato comprendente un sostituito GlcNAc- $S(A)_x$  (**2**) e una modificazione di anticorpo (**1b**) conduce ad un anticorpo modificato comprendente due sostituenti GlcNAc- $S(A)_x$  (**3**).



Schema 1

- [0075]** Molti catalizzatori idonei per il processo in conformità con l'invenzione sono noti  
 10 nella tecnica. Un catalizzatore idoneo per un processo specifico è un catalizzatore per cui il nucleotide del derivato di zucchero specifico  $S(A)_x\text{-P}$  in quel processo specifico è un substrato. Preferibilmente, il catalizzatore è selezionato dal gruppo di galattosiltransferasi, più preferibilmente dal gruppo di  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi o  $\alpha(1,3)$ -N-galattosiltransferasi, ancor più preferibilmente dal gruppo di  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi o  
 15  $\alpha(1,3)$ -N-galattosiltransferasi comprendente un dominio catalitico mutante.

[0076] Un catalizzatore idoneo è per esempio un catalizzatore che comprende un dominio catalitico mutante da una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi I. Un dominio catalitico si riferisce qui ad un segmento di aminoacido che ripiega in un dominio che è in grado di catalizzare la concatenazione del nucleotide del derivato di zucchero specifico S(A)<sub>x</sub>-P al sostituente DI GlcNAc del nucleo, in un processo specifico in conformità con l'invenzione. Un dominio catalitico può avere una sequenza di aminoacidi come quella che si trova in un enzima di tipo selvatico, o avere una sequenza di aminoacidi che è differente da una sequenza di tipo selvatico. Un dominio catalitico avente una sequenza di aminoacidi che è differente da una sequenza di tipo selvatico è qui indicato come dominio catalitico mutante. La mutazione può comprendere per es. un cambio di aminoacido singolo (una mutazione puntiforme), ma anche un cambio di aminoacido multiplo (per es. da 1 a 10, preferibilmente da 1 a 6, più preferibilmente di 1, 2, 3 o 4, ancor più preferibilmente di 1 o 2 aminoacidi), o una delezione o inserzione di uno o più (per es. da 1 a 10, preferibilmente da 1 a 6, più preferibilmente di 1, 2, 3 o 4, ancor più preferibilmente di 1 o 2) aminoacidi. Detto dominio catalitico mutante può essere presente in un enzima a lunghezza intera, per es. un enzima  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi I, ma può essere presente anche per es. in un frammento di polipeptide o un polipeptide ricombinante comprendente detto dominio catalitico mutante, opzionalmente legato ad aminoacidi addizionali.

[0077]  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi I è qui ulteriormente indicata come GalT. Tali domini catalitici mutanti di GalT sono divulgati per esempio nel WO 2004/063344 (National Institutes of Health). Il WO 2004/063344 divulga mutanti Tyr-289 di GalT, che sono indicati Y289L, Y289N e Y289I. Il metodo di preparazione di detti domini catalitici mutanti Y289L, Y289N e Y289I è illustrato in dettaglio nel WO 2004/063344, p. 34,1. 6 - p. 36,1. 2.

[0078] I domini mutanti di GalT che catalizzano la formazione di un legame di glucosio-

- $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosammina sono divulgati nel WO 2004/063344 a p. 10, 1,25 - P. 12,1. 4. I domini mutanti di GalT che catalizzano la formazione di un legame N-acetilgalattosammina-  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosammina sono divulgati nel WO 2004/063344 a p. 12, 1,6 - p. 13,1. 2. I domini mutanti GalT che catalizzano la formazione
- 5 di un legame di N-acetilglucosammina- $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosammina e un legame di mannosio- $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosammina sono divulgati nel WO 2004/063344 a p. 12, 1,19 - p. 14,1. 6. I domini mutanti di GalT divulgati potrebbero essere inclusi negli enzimi a lunghezza intera di GalT, o in molecole ricombinanti contenenti i domini catalitici, come divulgato nel WO 2004/063344 a p. 14,1,31-p. 16. 1,28.
- 10 **[0079]** Un altro dominio mutante di GalT è per esempio Y284L, divulgato da Bojarová et al., Glycobiology 2009, 19, 509. La mutazione nella posizione 284 riguarda un residuo di tirosina.
- [0080]** Un altro dominio mutante di GalT è per esempio R228K, divulgato da Qasba et al., Glycobiology 2002, 12, 691, in cui Arg228 è rimpiazzato da lisina.
- 15 **[0081]** In una forma di realizzazione preferita del processo per la preparazione di un anticorpo modificato in conformità con l'invenzione, detto catalizzatore è un catalizzatore comprendente un dominio catalitico mutante da una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi, preferibilmente una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi di bovino. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, detto catalizzatore è un catalizzatore comprendente un dominio
- 20 catalitico di mutante di GalT selezionato dal gruppo consistente di Y289L, Y289N, Y289I, Y284L e R228K, preferibilmente Y289L. In una forma di realizzazione specifica, il catalizzatore è un catalizzatore comprendente un dominio catalitico mutante da una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi, selezionato preferibilmente dal gruppo consistente di GalT Y289L, GalT Y289N e GalT Y289I, GalT più preferibilmente Y289L o GalT Y289N, e in maniera
- 25 maggiormente preferibile GalT Y289L.

[0082] In un'altra forma di realizzazione, il catalizzatore è un catalizzatore comprendente un dominio catalitico mutante da una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi di bovino, selezionato dal gruppo consistente di GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I e GalT Y289A, preferibilmente selezionato dal gruppo consistente di GalT Y289F e GalT Y289M, GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I e GalT Y289A può essere fornito per mezzo di processi di mutagenesi diretta al sito, in modo simile a quanto divulgato nel WO 2004/063344, in Qasba et al., Prot. Expr. Pur. 2003, 30,219 e in Qasba et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 20833 per Y289L, Y289N e Y289I. In GalT Y289F l'aminoacido tirosina (Y) alla posizione 289 è rimpiazzato da un aminoacido fenil alanina (F), in GalT Y289M detta tirosina è rimpiazzata da un aminoacido metionina (M), in GalT Y289V da un aminoacido valina (V), in GalT Y289G da un aminoacido glicina (G), in GalT Y289I da un aminoacido isoleucina (I), e in Y289A da un aminoacido analina (A).

[0083] Un altro tipo di catalizzatori idonei è un catalizzatore basato su  $\alpha(1,3)$ -N-galattosiltransferasi (ulteriormente indicato come a3Gal-T), preferibilmente  $\alpha(1,3)$ -N-acetilgalattosaminiltransferasi (ulteriormente indicato come a3GalNAc-T), come divulgato nel WO 2009/025646. La mutazione di a3Gal-T può ampliare la specificità del donatore dell'enzima, e renderlo un a3GalNAc-T. La mutazione di a3GalNAc-T può ampliare la specificità del donatore dell'enzima. Frammenti di polipeptidi e domini catalitici di  $\alpha(1,3)$ -N-acetilgalattosaminiltransferasi sono divulgati nel WO 2009/025646 a p. 26, l. 18 - P. 47, l. 15 e P. 77, l. 21 - p. 82, l. 4.

[0084] In una forma di realizzazione, il catalizzatore è una galattosiltransferasi di tipo selvatico, più preferibilmente una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi di tipo selvatico o una  $\beta(1,3)$ -N-galattosiltransferasi di tipo selvatico, e ancor più preferibilmente una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi I di tipo selvatico.  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi è qui ulteriormente

indicata come GalT. Ancor più preferibilmente, la  $\beta$  (1,4)-galattosiltransferasi è selezionata dal gruppo consistente di  $\beta$ (1,4)-Gal-T1 bovina,  $\beta$ (1,4)-Gal-T1 umana,  $\beta$ (1,4)-Gal-T2 umana,  $\beta$  (1,4)-Gal-T3 umana e  $\beta$  (1,4)-Gal-T4 umana. Ancor più preferibilmente, la  $\beta$ (1,4)-galattosiltransferasi è un  $\beta$  (1,4)-Gal-T1. Quando il catalizzatore è una  $\beta$ (1,3)-N-galattosiltransferasi di tipo selvatico, si preferisce una  $\beta$  (1,3)-Gal-T5 umana.

**[0085]** Questa forma di realizzazione in cui il catalizzatore è una galattosiltransferasi di tipo selvatico è particolarmente preferita quando un gruppo funzionale A nel derivato dello zucchero  $S(A)_x$  è presente su C2 o C6, preferibilmente C6, del detto derivato di zucchero. In questa forma di realizzazione, si preferisce ulteriormente che  $Su(A)_x$  comprenda un gruppo funzionale A, vale a dire preferibilmente  $x$  è 1. P,  $Su(A)_x$  e  $Su(A)_x$ -P sono descritti più in dettaglio di seguito.

**[0086]** Di conseguenza, la divulgazione si riferisce perciò anche ad un processo per la preparazione di una glicoproteina modificata, il processo comprendente la messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo (GlcNAc) con un composto della formula  $S(A)_x$ -P in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto catalizzatore è una galattosiltransferasi di tipo selvatico, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente  $x$  gruppi funzionali A, in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e in cui  $x$  è 1, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), e in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito di GlcNAc- $S(A)_x$  legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc- $S(A)_x$ .

**[0087]** Il processo per la preparazione di un anticorpo modificato è preferibilmente effettuato in una soluzione tampone idonea, come ad esempio fosfato, soluzione salina

tamponata (per es. soluzione salina tamponata con fosfato, soluzione salina tamponata con Tris), citrato, HEPES, tris e glicina. I tamponi idonei sono noti nella tecnica. Preferibilmente, la soluzione tampone è una soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) o un tampone tris.

5 [0088] Il processo è effettuato preferibilmente ad una temperatura nel range da circa 4 a circa 50°C, più preferibilmente nel range da circa 10 a circa 45°C, ancor più preferibilmente nel range da circa 20 a circa 40°C, e in maniera maggiormente preferibile nel range da circa 30 a circa 37°C.

[0089] Il processo è preferibilmente effettuato un pH nel range da circa 5 a circa 9, 10 preferibilmente nel range da circa 5.5 a circa 8.5, più preferibilmente nel range da circa 6 a circa 8. In maniera maggiormente preferibile, il processo viene effettuato ad un pH nel range da circa 7 a circa 8.

[0090] Nel processo, può essere usata una miscela di anticorpi come anticorpo di partenza, detta miscela comprendente anticorpi comprendenti uno o più sostituenti di GlcNAc del 15 nucleo e/o uno o più sostituenti di GlcNAc(Fuc) del nucleo. Per esempio quando la miscela di anticorpi di partenza comprende un anticorpo intero con un sostituito di GlcNAc del nucleo opzionalmente fucosilato su ciascuna catena pesante, l'anticorpo intero può comprendere due sostituenti di GlcNAc del nucleo, o due sostituenti di GlcNAc(Fuc) del nucleo, o un sostituito di GlcNAc del nucleo e un sostituito di GlcNAc(Fuc) del nucleo.

20 [0091] La GlcNAc nel sostituito di GlcNAc del nucleo del monosaccaride è in posizione terminale, mentre la GlcNAc nel disaccaride del sostituito di GlcNAc(Fuc) del nucleo è in una posizione interna, legato all'anticorpo per mezzo di C1 e a Fuc per mezzo di C6. Poiché, come è stato descritto sopra, detti catalizzatori di enzima mutante di galattosiltransferasi sono inoltre in grado di riconoscere zuccheri interni e derivati di 25 zuccheri come un derivato di zucchero accettore, S(A)<sub>x</sub> è legato al sostituito di GlcNAc

del nucleo nel processo in conformità con l'invenzione, a prescindere dal fatto se detta GlcNAc è fucosilata o meno. Vantaggiosamente, la rimozione di fucosio prima del processo in conformità con l'invenzione non è perciò necessaria, poiché può essere usata nel processo una miscela di anticorpi comprendente entrambi i sostituenti di GlcNAc dle  
 5 nucleo e GlcNAc(Fuc) del nucleo. Tuttavia, se si desidera, il fucosio può essere rimosso da qualsiasi dei sostituenti di GlcNAc(Fuc) del nucleo prima del processo in conformità con l'invenzione, ad esempio mediante defucosilazione in presenza di  $\alpha$ -fucosidasi come è noto nella tecnica.

**[0092]**  $S(A)_x$  è definito come un derivato di zucchero comprendente  $x$  gruppi funzionali  
 10  $A$ , in cui  $A$  è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile, e in cui  $x$  è 1, 2,3 o 4.

**[0093]** Un gruppo azoturo è un gruppo funzionale di azoturo  $-N_3$ . Un gruppo chetone è un gruppo  $-[C(R^7)_2]_oC(O)R^6$ , in cui  $R^6$  è un gruppo metile o un gruppo alchile  $C_2 - C_{24}$  opzionalmente sostituito,  $R^7$  è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di  
 15 idrogeno, alogeno e  $R^6$ , e  $o$  è 0 - 24, preferibilmente 0 - 10, e più preferibilmente 0, 1, 2, 3, 4,5 o 6. Preferibilmente,  $R^7$  è idrogeno. Un gruppo alchinile è preferibilmente un gruppo alchinile terminale o un gruppo (etero)cicloalchinile come definito sopra. In una forma di realizzazione il gruppo alchinile è un gruppo  $-[C(R^7)_2]_oC\equiv C-R^7$ , in cui  $R^7$  e  $o$  sono come definiti sopra;  $R^7$  è preferibilmente idrogeno.

**[0094]** Il derivato di zucchero  $S(A)_x$  può comprendere uno o più gruppi funzionali  $A$ .  
 20 Quando  $S(A)_x$  comprende due o più gruppi funzionali  $A$ , ciascun gruppo funzionale  $A$  è selezionato indipendentemente, vale a dire uno  $S(A)_x$  può comprendere gruppi funzionali  $A$  differenti, per es. un gruppo azoturo e un gruppo chetone, ecc. In una forma di realizzazione preferita,  $x$  è 1 o 2,  $x$  più preferibilmente è 1. In un'altra forma di  
 25 realizzazione preferita, il gruppo funzionale  $A$  è un gruppo azoturo o un gruppo chetone,

più preferibilmente un gruppo azoturo.

**[0095]** Il derivato di zucchero  $S(A)_x$  è derivato da uno zucchero o un derivato di zucchero S, per es. un amminozucchero o uno zucchero derivatizzato in altro modo. Gli esempi di zuccheri e derivati di zucchero includono galattosio (Gal), mannosio (Man), glucosio (Glc), acido glucuronico (Gcu) e fucosio (Fuc). Un amminozucchero è uno zucchero in cui un gruppo idrossile (OH) è rimpiazzato da un gruppo amminico e esempi includono N-acetilglucosammina (GlcNAc) e N-acetilgalattosammina (GalNAc). Esempi di un altro zucchero derivatizzato includono acido glucuronico (Gcu) e acido N-acetilneuraminico (acido sialico).

**[0096]** Un derivato di zucchero  $S(A)_x$  è preferibilmente derivato da galattosio (Gal), mannosio (Man), N-acetilglucosammina (GlcNAc), glucosio (Glc), N-acetilgalattosammina (GalNAc), acido glucuronico (Gcu), fucosio (Fuc) e acido N-acetilneuraminico (acido sialico), preferibilmente dal gruppo consistente di GlcNAc, Gal e GalNAc. Più preferibilmente  $S(A)_x$  è derivato da Gal o GalNAc, e in maniera maggiormente preferibile  $S(A)_x$  è derivato da GalNAc.

**[0097]** L'uno o più gruppi funzionali A in  $S(A)_x$  possono essere legati allo zucchero o al derivato di zucchero S in molti modi. L'uno o più gruppi funzionali A possono essere legati a C2, C3, C4 e/o C6 dello zucchero o del derivato dello zucchero, al posto di un gruppo idrossile (OH). Si deve evidenziare che, poiché il fucosio è carente di un gruppo OH su C6, se A è legato a C6 di Fuc, allora A prende il posto di un atomo H.

**[0098]** Quando A è un gruppo azoturo, si preferisce che A sia legato a C2, C4 o C6. Come è stato descritto in precedenza, l'uno o più sostituenti di azoturo in  $S(A)_x$  possono essere legati a C2, C3, C4 o C6 dello zucchero o del derivato dello zucchero S, al posto di un gruppo idrossile (OH) o, nel caso di 6-azoturofucosio (6-AzFuc), al posto di un atomo di idrogeno. In aggiunta o in alternativa, il sostituito di glucosaminidasi di un derivato di

amminozucchero può essere sostituito da un sostituito di azoturoacetile. In una forma di realizzazione preferita,  $S(A)_x$  è selezionato dal gruppo consistente di 2-azoturoacetamidogalattosio (GalNAz), 6-azoturo-6-deossigalattosio (6-AzGal), 6-azoturo-6-deossi-2-acetamidogalattosio (6-AzGalNAc), 4-azoturo-4-deossi-2-acetamidogalattosio (4-AzGalNAc), 6-azoturo-6-deossi-2-azidoacetamidogalattosio (6-AzGalNAz), 2-azoturoacetamidoglucosio (GlcNAz), 6-azoturo-6-deossiglucosio (6-AzGlc), 6-azoturo-6-deossi-2-acetamidoglucosio (6-AzGlcNAc), 4-azoturo-4-deossi-2-acetamidoglucosio (4-AzGlcNAc) e 6-azoturo-6-deossi-2-azidoacetamidoglucosio (6-AzGlcNAz), più preferibilmente dal gruppo consistente di GalNAz, 4-AzGalNAc, GlcNAz e 6-AzGlcNAc. Esempi di  $S(A)_x$ -P in cui A è un gruppo azoturo sono mostrati di seguito.

[0099] Quando A è un gruppo chetone, si preferisce che A sia legato a C2 al posto del gruppo OH di S. In alternativa, A può essere legato all'atomo N di un derivato di amminozucchero, preferibilmente un derivato di 2-amminozucchero. Il derivato di zucchero quindi comprende un sostituito  $-NC(O)R^6$ .  $R^6$  è preferibilmente un gruppo alchile  $C_2 - C_{24}$ , opzionalmente sostituito. Più preferibilmente,  $R^6$  è un gruppo etile. In una forma di realizzazione preferita  $S(A)_x$  è selezionato dal gruppo consistente di 2-deossi-(2-ossopropil)galattosio (2-chetoGal), 2-N-propionilgalattosammina (2-N-propionilGalNAc), 2-N-(4-ossopentanoil)galattosammina (2-N-LevGal) e 2-N-butirilgalattosammina (2-N-butirilGalNAc), più preferibilmente 2-chetoGalNAc e 2-N-propionilGalNAc. Esempi di  $S(A)_x$ -P in cui A è un gruppo chetone sono mostrati di seguito.

[0100] Quando A è un gruppo alchinile, preferibilmente un gruppo alchinile terminale o un gruppo (etero)cicloalchinile, si preferisce che detto gruppo alchinile sia presente su un derivato di 2-amminozucchero. Un esempio di  $S(A)_x$  in cui A è un gruppo alchinile è 2-

(but-3-acido ionico amido)-2-deossi-galattosio. Un esempio di  $S(A)_x-P$  in cui A è un gruppo alchinile è mostrato di seguito.

**[0101]** I composti della formula  $S(A)_x-P$ , in cui un monofosfato di nucleoside o un difosfato di nucleoside P è legato a un derivato dello zucchero  $S(A)_x$ , sono noti nella  
5 tecnica. Per esempio Wang et al., Chem. Eur. J. 2010, 16,13343-13345, Piller et al., ACS Chem. Biol. 2012, 7, 753, Piller et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15,5459-5462 e il WO 2009/102820, divulgano un certonumero di composti  $S(A)_x-P$  e le loro sintesi.

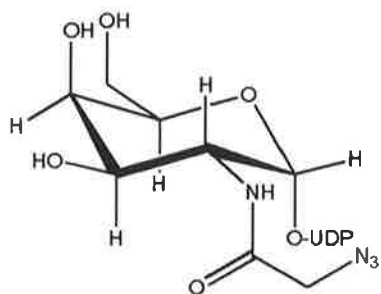
**[0102]** In una forma di realizzazione preferita, il monofosfato o difosfato di nucleoside P in  $S(A)_x-P$  è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di  
10 guanosina (GDP), difosfato di timidina (TDP), difosfato di citidina (CDP) e monofosfato di citidina (CMP), preferibilmente UDP.

**[0103]** Molti esempi (**5 - 10**) di bifosfati di uridina legati a zuccheri sostituiti con azoturo, sostituiti con chetone e sostituiti con alchinile e derivati di zucchero,  $S(A)_x-UDP$ , sono mostrati di seguito.

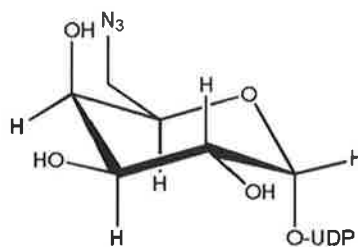
15

20

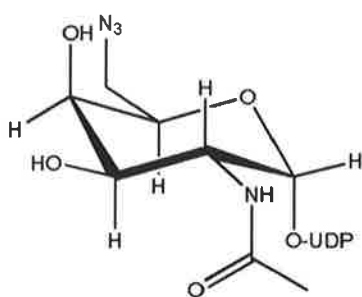
25



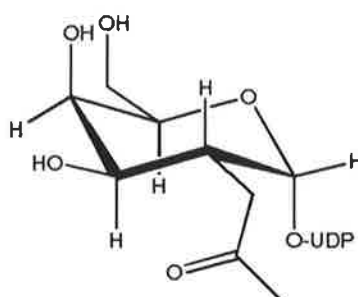
5



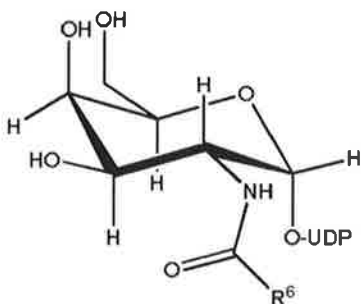
6



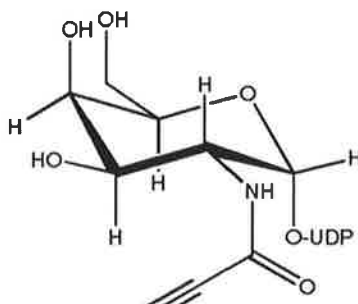
7



8



9

(R<sup>6</sup> = C<sub>2</sub> - C<sub>24</sub>alchile)

10

[0104] Preferibilmente, S(A)<sub>x</sub>-P è selezionato dal gruppo consistente di GalNAz-UDP (5), 6-AzGal-UDP (6), 6-AzGalNAc-UDP (7), 4-AzGalNAz-UDP, 6-AzGalNAz-UDP, 6-AzGlc-UDP, 6-AzGlcNAz-UDP, 2-ketoGal-UDP (8), 2-N-propionilGalNAc-UDP (9, in cui R<sup>6</sup> è etile) e 2-(but-3-acido ionico amido)-2-deossi-galattosio-UDP (10).

[0105] In maniera maggiormente preferibile, S(A)<sub>x</sub>-P è GalNAz-UDP (5) o 4-AzGalNAc-UDP (7).

Le sintesi di GalNAz-UDP (5) e 6-AzGalNAc-UDP (7) sono divulgate in Piller et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15,5459-5462 e Wang et al., Chem. Eur. J. 2010,  
5 16,13343-13345.

[0106] La sintesi di 2-chetoGal-UDP (8) viene illustrata in Qasba et al., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 16162, in particolare nelle informazioni di supporto.

[0107] La sintesi di 2-(but-3-acido inoico amido)-2-deossi-galattosio-UDP viene illustrata nel WO 2009/102820.

10 [0108] Come è stato descritto in precedenza, nel processo per la modificazione di un anticorpo in conformità con l'invenzione, S(A)<sub>x</sub>-P può essere qualsiasi nucleotide di un derivato dello zucchero che è un substrato per un catalizzatore idoneo di galattosiltransferasi.

[0109] Una forma di realizzazione preferita del processo in conformità con l'invenzione è  
15 mostrato in Figura 4. La Figura 4 mostra un anticorpo monoclonale (mAb) comprendente un sostituito, opzionalmente fucosilato (b = 0 o 1), di GlcNAc del nucleo su ciascuna catena pesante dell'anticorpo. Questi sostituiti di GlcNAc del nucleo (b = 0) e GlcNAc(Fuc) del nucleo (b = 1) sono convertiti rispettivamente in sostituiti di GlcNAc-GalNAz e GlcNAc(Fuc)-GalNAz. Detta conversione è eseguita per mezzo della reazione  
20 con GalNAz-UDP (5) in presenza di un enzima mutante GalT Y289L come catalizzatore.

[0110] La presente divulgazione si riferisce generalmente ad un processo per la preparazione di un anticorpo modificato, il processo comprendente:

(a) la fornitura di un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo opzionalmente fucosilata (sostituito di GlcNAc del nucleo), seguita da  
25

(b) la messa a contatto del detto anticorpo con un composto della formula  $S(A)_x$ -P in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è selezionato indipendentemente dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), e in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito di GlcNAc- $S(A)_x$  legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc- $S(A)_x$ .

**[0111]** L'anticorpo comprendente un sostituito di GlcNAc del nucleo opzionalmente fucosilata può essere fornito in una varietà di modi. Detti anticorpi, per es. anticorpi interi, frammenti di anticorpo, anticorpi geneticamente modificati, ecc. possono essere forniti mediante metodi che sono noti alla persona specializzata nella tecnica. Per esempio, frammenti Fab o Fc possono essere preparati mediante digestione proteolitica di molecole di immunoglobulina sostanzialmente intatte con papaina, o mediante espressione ricombinante delle porzioni desiderate di una catena pesante e leggera di immunoglobulina.

**[0112]** In una forma di realizzazione, il processo in conformità con l'invenzione comprende inoltre la deglicosilazione di un anticorpo glicano avente una N-acetilglucosammina del nucleo, in presenza di un'endoglicosidasi, allo scopo di ottenere un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo, in cui detta N-acetilglucosammina del nucleo e detto sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo sono opzionalmente fucosilati. In funzione della natura del glicano, può essere selezionata un'endoglicosidasi idonea. L'endoglicosidasi è preferibilmente selezionata dal gruppo

consistente di enzimi Endo S, Endo A, Endo F, Endo M, Endo D e Endo H e/o una  
combinazione delle stesse, la selezione dei quali dipende dalla natura del glicano. In  
un'ulteriore forma di realizzazione preferita, l'endoglicosidasi è Endo S, Endo S49, Endo  
F o una combinazione delle stesse. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita,  
5 l'endoglicosidasi è Endo S, Endo F o una combinazione delle stesse. In un'ulteriore forma  
di realizzazione preferita, l'endoglicosidase è Endo S. In un'altra forma di realizzazione  
preferita l'endoglicosidase è Endo S49.

**[0113]** Un glicano di anticorpo avente una N-acetilglucosammina del nucleo è definito qui  
come un anticorpo comprendente un glicano che è legato all'anticorpo per mezzo di C1 di  
10 una GlcNAc (GlcNAc del nucleo), opzionalmente fucosilata. Oltre alla detta GlcNAc del  
nucleo e all'opzionale Fuc, detto glicano comprende almeno ancora uno zucchero o un  
derivato dello zucchero.

**[0114]** Una forma di realizzazione preferita della detta fase di deglicosilazione del  
processo è mostrata in Figura 5, in cui una miscela di glicoforme di anticorpo G2F, G1F,  
15 G0F, G2, G1 e G0, e possibilmente più glicoforme come glicani triantennari, è convertita  
in anticorpi comprendenti un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo  
opzionalmente fucosilata (b è 0 o 1). Le glicoforme G2F, G1F, G0F, G2, G1 e G0 sono  
mostrate nella Figura 1.

**[0115]** La presente divulgazione perciò si riferisce anche a un processo per la preparazione  
20 di un anticorpo modificato, il processo comprendente:

(a) la deglicosilazione di un glicano di anticorpo avente una N-acetilglucosammina  
del nucleo, in presenza di un'endoglicosidasi, allo scopo di ottenere un anticorpo  
comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo, in cui detto  
sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato,  
25 seguito da

(b) la messa a contatto del detto anticorpo con un composto della formula  $S(A)_x$ -P in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato dello zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2,3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), e in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito GlcNAc- $S(A)_x$  legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc- $S(A)_x$ .

**[0116]** La presente invenzione si riferisce anche ad un processo per la preparazione di un anticorpo modificato, il processo comprendente:

(a) la deglicosilazione di un glicano di anticorpo avente una N-acetilglucosammina del nucleo, in presenza di un'endoglicosidasi, allo scopo di ottenere un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo, in cui detto sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è legato per mezzo di un legame N-glicosidico all'atomo di azoto dell'ammide nella catena laterale di un aminoacido dell'anticorpo asparagina, e in cui detta endoglicosidasi è Endo S, Endo S49, Endo F, o una combinazione delle stesse; seguita da

(b) la messa a contatto del detto anticorpo con un composto della formula  $S(A)_x$ -P in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un

gruppo alchinile e x è 1, 2,3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP),

in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito  
5 GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>.

[0117] In una forma di realizzazione preferita, detta endoglicosidasi è selezionata dal gruppo consistente di Endo S, Endo F, o una combinazione delle stesse. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, l'endoglicosidasi è Endo S, Endo F o una combinazione  
10 delle stesse. In una forma di realizzazione ancor più preferita, detta endoglicosidasi è Endo S. In un'altra forma di realizzazione preferita, detta endoglicosidasi è Endo S49. In un'altra forma di realizzazione preferita, detta endoglicosidasi è selezionata dal gruppo consistente di Endo S, Endo S49, Endo F e/o una combinazione delle stesse. Più preferibilmente, detta endoglicosidasi è Endo S o Endo S49. In maniera maggiormente preferibile, detta  
15 endoglicosidasi è Endo S o Endo F.

[0118] Endo S, Endo A, Endo F, Endo M, Endo D e Endo H sono note alla persona specializzata nella tecnica. Endo S49 viene descritta nel WO 2013/037824 (Genovis AB). Endo S49 è isolata da *Streptococcus pyogenes* NZ131 ed è un omologo di Endo S. Endo S49 ha un'attività di endoglicosidasi specifica su IgG nativo e cliva una varietà maggiore  
20 di glicani Fc rispetto ad Endo S.

[0119] In una forma di realizzazione preferita, detta N-acetilglucosammina del nucleo è presente in un sito di N-glicosilazione nativo dell'anticorpo. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, l'anticorpo è IgG e detta N-acetilglucosammina del nucleo è presente in un sito di N-glicosilazione nativo dell'IgG. In un'ulteriore forma di  
25 realizzazione preferita, l'anticorpo è IgG, detta N-acetilglucosammina del nucleo è



presente in un sito di N-glicosilazione nativo dell'IgG, e il sito nativo è il sito di N-glicosilazione N297 di IgG. Il sito di N-glicosilazione N297 è presente nella regione Fc della catena pesante di un anticorpo IgG.

[0120] Quando detta N-acetilglucosammina del nucleo è presente in un sito di N-glicosilazione nativo di un anticorpo IgG, si preferisce che l'endoglicosidasi sia selezionata dal gruppo consistente di Endo S, Endo S49 e Endo F, e una combinazione delle stesse. Più preferibilmente, l'endoglicosidasi è Endo S, Endo S49 o Endo F, ancor più preferibilmente Endo S o Endo F, e in maniera maggiormente preferibile Endo S. Come è noto nella tecnica, Endo H, Endo M, Endo F1 sono meno idonee per la deglicosilazione di un glicano che è presente nel sito nativo di un anticorpo IgG. In particolare, sono meno idonee per la deglicosilazione di un glicano che è presente in N297.

#### *Anticorpo modificato*

[0121] La divulgazione si riferisce anche a un anticorpo ottenibile mediante il processo per la preparazione di un anticorpo modificato in conformità con l'invenzione. Detto processo per la preparazione di un anticorpo modificato, come pure forme di realizzazione preferite dello stesso, sono descritte in dettaglio in precedenza.

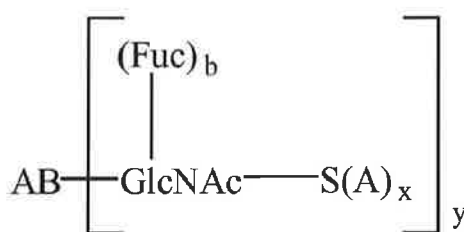
[0122] La divulgazione si riferisce inoltre ad un anticorpo comprendente un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, in cui GlcNAc è una N-acetilglucosammina, in cui S(A)<sub>x</sub> è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2, 3 o 4, in cui detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detta N-acetilglucosammina è opzionalmente fucosilata.

Tale anticorpo è qui indicato come anticorpo modificato.

[0123] In una forma di realizzazione, l'anticorpo modificato ha la Formula (4), in cui AB



5 rappresenta un anticorpo, GlcNAc è N-acetilglucosammina, Fuc è fucosio, b è 0 o 1 e y è da 1 a 20, e in cui S(A)<sub>x</sub> è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2, 3 o 4. In una forma di realizzazione preferita, y è da 1 a 10, più preferibilmente y è 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8, ancor più



## 4

preferibilmente y è 1, 2, 3 o 4 e in maniera maggiormente preferibile y è 1 o 2.

[0124] Il derivato di zucchero S(A)<sub>x</sub> nel sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> dell'anticorpo modificato può essere per esempio legato a C4 della GlcNAc per mezzo di un legame β(1,4)-glicosidico o a C3 della detta GlcNAc per mezzo di un legame α(1,3)-glicosidico.

10 La N-acetilglucosammina del detto sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è legata per mezzo di C1 all'anticorpo, preferibilmente per mezzo di un legame N-glicosidico all'atomo di azoto dell'ammide nella catena laterale di un aminoacido di asparagina dell'anticorpo (GlcNAcβ1-Asn). La GlcNAc nel detto sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è opzionalmente fucosilata. Il fatto se il derivato di zucchero S(A)<sub>x</sub> nel sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> dell'anticorpo modificato è legato a C4 della GlcNAc per mezzo di un legame β(1,4)-glicosidico o a C3 della detta GlcNAc per mezzo di un legame α(1,3)-glicosidico dipende dal catalizzatore che è stato usato nel processo per la preparazione dell'anticorpo modificato. Quando il processo viene effettuato in presenza di un catalizzatore di β(1,4)-galattosiltransferasi allora il legame avviene per mezzo di C1 di S(A)<sub>x</sub> e C4 di GlcNAc per mezzo di un legame β(1,4)-glicosidico. Quando il processo viene effettuato in presenza

20

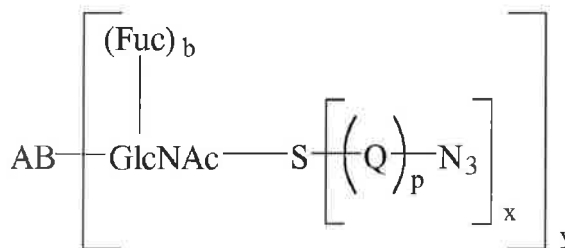
di un catalizzatore di  $\alpha(1,3)$ -galattosiltransferasi allora il legame avviene per mezzo di C1 di  $S(A)_x$  e C3 di GlcNAc per mezzo di un legame  $\alpha(1,3)$ -glicosidico.

[0125] Quando A è un gruppo azoturo funzionale, l'anticorpo modificato è indicato come un anticorpo di azoturo modificato. Quando A è un gruppo chetone funzionale, l'anticorpo modificato è indicato come un anticorpo chetonico modificato. Quando A è un gruppo alchinile funzionale, l'anticorpo modificato è indicato come un anticorpo modificato da alchino. Preferibilmente, l'anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo o chetone, più preferibilmente un anticorpo modificato da azoturo.

[0126] In una forma di realizzazione preferita, detto  $S(A)_x$  è derivato da un derivato di zucchero o zucchero selezionato dal gruppo consistente di galattosio (Gal), mannosio (Man), N-acetilglucosammina (GlcNAc), glucosio (Glc), N-acetilgalattosammina (GalNAc), acido glucuronico (Gcu), fucosio (Fuc) e acido N-acetilneuraminico (acido sialico), preferibilmente Gal, GlcNAc, glucosio e GalNAc.

[0127] In un'altra forma di realizzazione preferita  $S(A)_x$  è selezionato dal gruppo consistente di GalNAz, 6-AzGal, 6-AzGalNAc, 4-AzGalNAz, 6-AzGalNAz, 6-AzGlc, 6-AzGlcNAz, 2-ketoGal, 2-N-propionilGalNAc e 2-(but-3-acido ionico amido)-2-deossi-galattosio. In maniera maggiormente preferibile,  $S(A)_x$  è GalNAz o 4-AzGalNAc.

[0128] In un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, vale a dire un gruppo funzionale A in  $S(A)_x$  è un gruppo azoturo. Un anticorpo modificato da azoturo può avere la struttura mostrata di seguito, in cui  $S(A)_x$ , con A è azoturo, è illustrato come  $S[(Q)_p-N_3]_x$ :



in cui:

B è 0 o 1;

x è 1, 2, 3 o 4;

S è un derivato dello zucchero;

5 p è 0 o 1;

Q è -N(H)C(O)CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-;

Y è 1 - 20;

in cui AB è un anticorpo, S è uno zucchero o un derivato dello zucchero, GlcNAc è N-acetilglucosammina. GlcNAc è opzionalmente fucosilata (b è 0 o 1).

10 **[0129]** L'anticorpo modificato da azoturo può comprendere da 1 a 20 sostituenti GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> opzionalmente fucosilati (y è da 1 a 20). Preferibilmente, y è da 1 a 10, più preferibilmente y è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, ancor più preferibilmente y è 1, 2, 3 o 4 e in maniera maggiormente preferibile y è 1 o 2.

**[0130]** Il valore di p e la natura di Q dipendono dal derivato di zucchero sostituito da  
 15 azoturo S(A)<sub>x</sub> che è presente nell'anticorpo modificato da azoturo. Se un gruppo azoturo in S(A)<sub>x</sub> è presente alla posizione C2, C3, o C4 dello zucchero o del derivato di zucchero, vale a dire al posto del gruppo OH dello zucchero, allora p è 0. Se un gruppo azoturo in S(A)<sub>x</sub> è un gruppo 2-azoturoacetamido, vale a dire S(A)<sub>x</sub> è per es. GalNAz o GlcNAz, allora p è 1 e Q è -N(H)C(O)CH<sub>2</sub>-. Se un gruppo azoturo in S(A)<sub>x</sub> è presente alla posizione  
 20 C6 dello zucchero o del derivato di zucchero, vale a dire al posto di un gruppo OH dello zucchero o nel caso di 6-AzFuc al posto di un atomo H, allora p è 1 e Q è -CH<sub>2</sub>-.

**[0131]** Preferibilmente, l'anticorpo modificato è un anticorpo monoclonale, più preferibilmente selezionato dal gruppo consistente di anticorpi IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. In modo ancor più preferibile, detto anticorpo è un anticorpo IgG, e in maniera  
 25 maggiormente preferibile detto anticorpo è un anticorpo IgG1. Quando l'anticorpo

modificato è un anticorpo intero, l'anticorpo comprende preferibilmente due o più, più preferibilmente due, sostituenti GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, detti sostituenti GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> essendo opzionalmente fucosilati. Tuttavia, se l'anticorpo modificato è un frammento di anticorpo, per es. un frammento Fab o Fc, l'anticorpo può avere soltanto un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, che è opzionalmente fucosilato.

[0132] Nell'anticorpo modificato, il sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> può essere situato ovunque sull'anticorpo, a condizione che detto sostituito non ostacoli il legame di un antigene del sito di legame dell'antigene dell'anticorpo. In una forma di realizzazione, detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è situato nel dominio Fc dell'anticorpo, più preferibilmente nel dominio C<sub>H</sub>2. In un'altra forma di realizzazione, detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è situato sul dominio Fab dell'anticorpo. In un'altra forma di realizzazione, detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è situato su un frammento di anticorpo Fab o Fc.

[0133] Come è stato descritto in precedenza, il processo per la preparazione dell'anticorpo modificato può fornire anticorpi modificati comprendenti più di un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>. Il numero di sostituenti sugli anticorpi dipende non soltanto dalla natura dell'anticorpo che deve essere modificato (per es. anticorpo intero, catena singola, frammento, ecc.), ma anche dal numero di sostituenti di GlcNAc del nucleo che è presente nell'anticorpo che deve essere modificato.

***Processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo***

[0134] La presente invenzione si riferisce anche all'uso dell'anticorpo modificato in conformità con l'invenzione nella preparazione di un coniugato di anticorpo (AC) [Antibody Coniugate]. Un coniugato di anticorpo (AC) è definito qui come un anticorpo che è coniugato ad una molecola di interesse (D) per mezzo di un linker (L). Il coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione può essere coniugato ad una o a più di una molecola di interesse (D) per mezzo del detto linker (L).

**[0135]** Una molecola di interesse può essere per esempio una molecola reporter, una sostanza attiva, un enzima, una proteina (non catalitica), un peptide, un oligonucleotide, un glicano, un azoturo o una frazione di (etero)cicloalchinile, preferibilmente una frazione di (etero)cicloalchinile bifunzionale o bivalente. Ulteriori esempi di una molecola di interesse includono un composto diagnostico, un aminoacido (comprendente un aminoacido innaturale), un polipeptide, una diammina di (poli)etilenglicole (per es. 1,8-diamino-3,6-diossaottano o equivalenti comprendenti catene di etilenglicole più lunghe), una catena di polietilenglicole, una catena di ossido di polietilene, una catena di polipropilenglicole, una catena di ossido di polipropilene e 1,X-diaminoalcano (in cui x è il numero di atomi di carbonio nell'alcano). In una forma di realizzazione preferita, la molecola di interesse è selezionata dal gruppo consistente di un aminoacido (in particolare lisina), una sostanza attiva, una molecola reporter, un azoturo e una frazione di (etero)cicloalchinile. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la molecola di interesse è selezionata dal gruppo consistente di una sostanza attiva, una molecola reporter, un azoturo e una frazione di (etero)cicloalchinile.

**[0136]** Una sostanza attiva è una sostanza farmacologica e/o biologica, vale a dire una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva, per esempio un farmaco o un profarmaco, un agente diagnostico, una proteina, un peptide, un aminoacido, un glicano, un lipide, una vitamina, uno steroide, un nucleotide, un nucleoside, un polinucleotide, RNA o DNA. Esempi di marcatori di peptide idonei includono una lattoferrina come peptidi di penetrazione cellulare, tipo lattoferrina o poliarginina. Un esempio di un glicano idoneo è oligomannosio.

**[0137]** In una forma di realizzazione preferita, la sostanza attiva è selezionata dal gruppo consistente di farmaci e profarmaci. Più preferibilmente, la sostanza attiva è selezionata dal gruppo consistente di composti farmaceuticamente attivi, in particolare composti da



basso a medio peso molecolare (per es. da circa 200 a circa 1500 Da, preferibilmente da circa 300 a circa 1000 Da), come ad esempio citotossine, agenti antivirali, agenti antibatterici, peptidi e oligonucleotidi. Esempi di citotossine includono camptotecina, staurosporina, doxorubicina, daunorubicina, colchicina, metotrexato, taxani, calicheamicine, duocarmicine, maitansine e maitansinoidi (vale a dire derivati di maitansine), auristatine, tubulisina M, criptoficina o pirrolobenzodiazepine (PBD). Esempi di auristatine includono dolastatina 10, auristatina F, monometile auristatina F (MMAF), auristatina E, monometile auristatina E (MMAE), auristatina PE, auristatina TP e auristatina AQ. Esempi di maitansine e maitansinoidi includono mertansine e ansamitocina.

**[0138]** Una molecola reporter è una molecola la cui presenza è prontamente rilevata, per esempio un agente diagnostico, un colorante, un fluoroforo, una marcatura di isotopo radioattivo, un agente di contrasto, un agente di imaging a risonanza magnetica o marcatura di massa. Esempi di un fluoroforo includono qualsiasi tipo di Alexa Fluor (e.g. Alexa Fluor 555), coloranti di cianina (per es. Cy3 o Cy5), derivati di cumarina, fluoresceina, rodamina, alloficocianina e cromomicina.

**[0139]** Esempi di una marcatura di isotopo radioattivo includono  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{131}\text{I}$  o  $^{123}\text{I}$ , che possono o meno essere collegati per mezzo di una parte chelante come DTPA, DOTA, NOTA or HYNIC.

**[0140]** Nel coniugato di anticorpo (AC) in conformità con l'invenzione, la molecola di interesse è coniugata all'anticorpo per mezzo di un linker (L). I Linker o le unità di collegamento sono ben noti nella tecnica, e sono descritti in maggior dettaglio di seguito.

**[0141]** La divulgazione si riferisce anche ad un processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo, comprendente la reazione dell'anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui detto coniugato di linker comprende un gruppo B funzionale e

una o più molecole di interesse, in cui detto gruppo B funzionale è un gruppo funzionale che è in grado di reagire con un gruppo A funzionale di un sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> sul detto anticorpo modificato. Detto coniugato di linker ha preferibilmente la formula B-L(D)<sub>r</sub>, in cui B, L e D sono come definiti in precedenza, e r è 1 - 20, preferibilmente r è 1 - 10, r più preferibilmente è 1 - 8, ancor più preferibilmente r è 1, 2, 3, 4,5 o 6, ancor più preferibilmente r è 1, 2, 3 o 4 e in maniera maggiormente preferibile r è 1 o 2.

**[0142]** I gruppi B funzionali complementari per il gruppo A funzionale sull'anticorpo modificato (A è un gruppo azoturo, un gruppo chetone o un gruppo alchinile) sono noti nella tecnica.

10 **[0143]** Quando A è un gruppo azoturo, il collegamento dell'anticorpo modificato da azoturo e il coniugato di linker avviene preferibilmente per mezzo di una reazione di cicloaddizione. Il gruppo B funzionale è poi preferibilmente selezionato dal gruppo consistente di gruppi alchinile, preferibilmente gruppi alchinile terminali, e gruppi (etero)cicloalchinile.

15 **[0144]** Quando A è un gruppo chetone, il collegamento dell'anticorpo modificato da chetone con il coniugato di linker avviene preferibilmente per mezzo della coniugazione selettiva con derivati di idrossilammina o idrazine, comportando rispettivamente ossime o idrazoni. Il gruppo B funzionale è quindi preferibilmente un gruppo amminico primario, per es. un gruppo -NH<sub>2</sub>, un gruppo amminosi, per es. -O-NH<sub>2</sub>, o un gruppo idrazinile, per  
20 es. -N(H)NH<sub>2</sub>. Il coniugato di linker è quindi rispettivamente preferibilmente H<sub>2</sub>N-L(D)<sub>r</sub>, H<sub>2</sub>N-O-L(D)<sub>r</sub> o H<sub>2</sub>N-N(H)-L(D)<sub>r</sub>, in cui L, D e r sono come definiti in precedenza.

**[0145]** Quando A è un gruppo alchinile, il collegamento dell'anticorpo modificato da alchino con il coniugato di linker avviene preferibilmente mediante una reazione di cicloaddizione, preferibilmente una cicloaddizione 1,3-dipolare. Il gruppo B funzionale è  
25 poi preferibilmente un 1,3-dipolo, come un azoturo, un nitrone o un ossido di nitrile. Il

coniugato di linker è quindi preferibilmente  $N_3-L(D)_r$ , in cui L, D e r sono come definiti in precedenza.

**[0146]** La divulgazione si riferisce così anche ad un processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo, comprendente la reazione dell'anticorpo modificato in conformità con l'invenzione con un coniugato di linker, in cui:

- a. quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, detto coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile o un gruppo alchinile, e una o più molecole di interesse; o
- b. quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da chetone, detto coniugato di linker comprende un gruppo ammina primaria, un gruppo amminossi o un gruppo idrazinile, e una o più molecole di interesse; o
- c. quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da alchino, detto coniugato di linker comprende un gruppo azoturo, e una o più molecole di interesse.

**[0147]** La presente invenzione si riferisce anche ad un processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo, comprendente la reazione di un anticorpo modificato da azoturo con un coniugato di linker, in cui detto coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile o un gruppo alchinile terminale, e una o più molecole di interesse.

**[0148]** Nel detto processo, un azoturo sull'anticorpo modificato da azoturo in conformità con l'invenzione reagisce con un gruppo alchinile, preferibilmente un gruppo alchinile terminale, o un gruppo (eter)cicloalchinile del coniugato di linker per mezzo di una reazione di cicloaddizione. Questa reazione di cicloaddizione di una molecola comprendente un azoturo con una molecola comprendente un gruppo alchinile terminale o un gruppo (etero)cicloalchinile è una delle reazioni che è nota nella tecnica come "chimica click". Nel caso di un coniugato di linker comprendente un gruppo alchinile



terminale, detta reazione di cicloadizione reazione deve essere effettuata in presenza di un catalizzatore idoneo, preferibilmente un catalizzatore di Cu(I). Tuttavia, in una forma di realizzazione preferita, il coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile, più preferibilmente un gruppo (etero)cicloalchinile deformato.

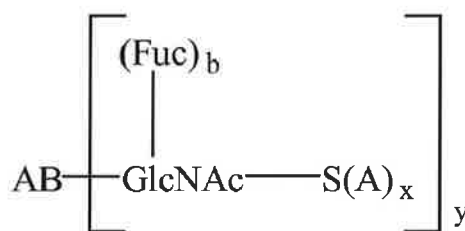
5 Quando il gruppo (etero)cicloalchinile è un gruppo (etero)cicloalchinile deformato, la presenza di un catalizzatore non è necessaria, e detta reazione può anche avvenire spontaneamente mediante una reazione chiamata cicloadizione di azoturo-alchino promossa dal ceppo (SPAAC). Questa è una delle reazioni note nella tecnica come "chimica click priva di metalli". I gruppi (etero)cicloalchinile deformati sono noti nella  
10 tecnica e sono descritti in maggiore dettaglio di seguito.

[0149] Perciò, in una forma di realizzazione preferita, il processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo comprende la reazione di un anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui detto coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile e una o più molecole di interesse, in cui detto anticorpo modificato è  
15 un anticorpo comprendente un sostituente  $\text{GlcNAc-S(A)}_x$ , in cui GlcNAc è una N-acetilglucosammina, in cui  $\text{S(A)}_x$  è un derivato dello zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è un gruppo azoturo e x è 1, 2, 3 o 4, in cui detto sostituente  $\text{GlcNAc-S(A)}_x$  è legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituente  $\text{GlcNAc-S(A)}_x$ , e in cui detta GlcNAc è opzionalmente fucosilata. In  
20 un'ulteriore forma di realizzazione preferita, detto gruppo (etero)cicloalchinile è un gruppo (etero)cicloalchinile deformato.

[0150] In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, detto processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo comprende le fasi di:

(i) la messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo (GlcNAc) con un composto della formula  $\text{S(A)}_x\text{-P}$   
25

in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è un gruppo azoturo e x è 1, 2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), per ottenere un anticorpo modificato, in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituente GlcNAc- $S(A)_x$  legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituente GlcNAc- $S(A)_x$ , e in cui detto anticorpo modificato è in



4

conformità alla Formula (4):

in cui:

$S(A)_x$  e x sono come da definizione sopra; AB rappresenta un anticorpo;

GlcNAc è N-acetilglucosammina; Fuc è fucosio; b è da 0 o 1; e y è da 1 a

20; e

(ii). la reazione del detto anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui detto coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile e una o più molecole di interesse.

[0151] Un vantaggio di questa forma di realizzazione del processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione è che la presenza di un

catalizzatore di rame non è necessaria. Detto processo così procede in assenza di un catalizzatore di rame. La presenza di un catalizzatore di rame nel detto processo ha tuttavia molti svantaggi. Generalmente, il procedimento più conveniente per la coniugazione di azoturo ad alchini terminali richiede la presenza di Cu(I). Il rame (I) è tipicamente generato *in situ* da Cu(II), che richiede l'aggiunta di un agente riducente appropriato, per es. DTT, ascorbato di sodio o idrazina e l'aggiunta di un ligando idoneo per mantenere il rame nello stato di ossidazione di Cu(I). Tuttavia, un'ottimizzazione estesa e a regolazione precisa delle condizioni può essere richieste per trovare i parametri ottimali per una conversione efficiente. Nondimeno anche in tali condizioni, la formazione concomitante di specie di ossigeno reattive non può sempre essere completamente evitata, il che a sua volta può indurre un danno ossidativo alla proteina, per esempio ossidazione dei legami di metionina, istidina, cisteina o disolfuro. Altri protocolli hanno impiegato sorgenti di rame(I) come CuBr per la marcatura di cellule fissate e la sintesi delle glicoproteine. In questi casi, l'instabilità di CuI nell'aria impone la necessità di grande eccessi di Cu (maggiori di 4 mm) e ligando per reazioni efficienti, il che solleva anche delle preoccupazioni circa il danno proteico o la precipitazione, più la presenza di metallo residuo dopo la purificazione. Si è riscontrato che la coniugazione di anticorpi contenenti azoturo ad alchini terminali in presenza di rame conduce alla formazione di prodotti secondari estesi mediante un' indesiderata ossidazione di aminoacidi. Per esempio, l'analisi degli spettri di massa ad alta risoluzione della catena leggera di trastuzumab (LC) dopo la coniugazione catalizzata da rame indica la formazione di >20 % di specie con pesi molecolari +16/+18 (vedasi Figura 31). L'analisi dettagliata dei frammenti peptidici della catena pesante di trastuzumab (HC) dopo la digestione triptica indica l'ossidazione di almeno un'istidina particolare pari al 69 %, come esemplificato nell'esempio 39. L'analisi dettagliata dei frammenti peptidici della catena leggera di trastuzumab (LC) dopo la

digestione triptica indica l'ossidazione di almeno una metionina particolare, esemplificata anche nell'esempio 39.

**[0152]** Le molecole di interesse sono descritte in maggiore dettaglio in precedenza. In una forma di realizzazione preferita, la molecola di interesse è selezionata dal gruppo  
5 consistente di una sostanza attiva, una molecola reporter, un azoturo e un gruppo (etero)cicloalchinile, più preferibilmente una sostanza attiva, una molecola reporter e un azoturo. Quando la molecola di interesse è un gruppo (etero)cicloalchinile, si preferisce che detta parte sia una frazione di (etero)cicloottino. Le strutture preferite di gruppi (etero)cicloottino sono descritte in maggiore dettaglio di seguito.

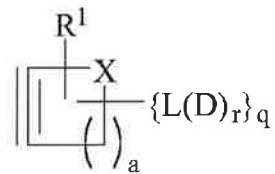
10 **[0153]** Il processo per la preparazione di un anticorpo modificato in conformità con l'invenzione è effettuato preferibilmente ad una temperatura nel range da circa 20 a circa 50 °C, più preferibilmente nel range da circa 25 a circa 45 °C, ancor più preferibilmente nel range da circa 30 a circa 40 °C, e in maniera maggiormente preferibile nel range da circa 32 a circa 37 °C.

15 **[0154]** Il processo è effettuato preferibilmente ad un pH nel range da circa 5 a circa 9, preferibilmente nel range da circa 5.5 a circa 8.5, più preferibilmente nel range da circa 6 a circa 8. In maniera maggiormente preferibile, il processo viene effettuato ad un pH nel range da circa 7 a circa 8.

**[0155]** Il processo è effettuato preferibilmente nell'acqua. Più preferibilmente, detta acqua  
20 è acqua purificata, ancor più preferibilmente acqua ultrapura o acqua di tipo I come definita in conformità a ISO 3696. L'acqua idonea è per esempio acqua milliQ®. Detta acqua è preferibilmente tamponata, per esempio con una soluzione salina tamponata con fosfato o tris. I tamponi idonei sono noti ad una persona specializzata nella tecnica. In una  
25 forma di realizzazione preferita, il processo viene effettuato in acqua milliQ che è tamponata con soluzione salina tamponata con fosfato o tris.

[0156] Preferibilmente, il coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile.

In una forma di realizzazione preferita detto coniugato di linker ha la Formula (11):



11

in cui:

5 L è un linker;

D è una molecola di interesse;

r è 1 - 20;

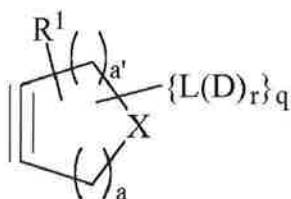
10 R<sup>1</sup> È indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi -OR<sup>5</sup>, -NO<sup>2</sup>, -CN, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e gruppi eteroarilalchile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e in cui i gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e i gruppi (etero)arilalchile sono opzionalmente sostituiti, in cui due sostituenti R<sup>1</sup> possono essere collegati assieme per formare un cicloalchile con aggiunta di un anello o un

15 sostituente (etero)arene con aggiunta di un anello, e in cui R<sup>5</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub> -C<sub>24</sub>;

X è C(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>, O, S o NR<sup>2</sup>, in cui R<sup>2</sup> è R<sup>1</sup> o L(D)<sub>r</sub>, e in cui L, D e r sono come definiti in precedenza;

20 Q è 0 o 1, a condizione che se q è 0 allora X è N-L(D)<sub>r</sub>; e a è 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8.

[0157] In un'altra forma di realizzazione preferita detto coniugato di linker ha la Formula (11b):



11b

in cui:

L è un linker;

5 D è una molecola di interesse;

r è 1 - 20;

10 R<sup>1</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi -OR<sup>5</sup>, -NO<sup>2</sup>, -CN, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e in cui i gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e i gruppi (etero)arilalchile sono opzionalmente sostituiti, in cui i due sostituenti R<sup>1</sup> possono essere collegati assieme per formare un cicloalchile con anello aggiunto o un

15 sostituente di (etero)arene con anello aggiunto, e in cui R<sup>5</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>;

X è C(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>, O, S o NR<sup>2</sup>, in cui R<sup>2</sup> è R<sup>1</sup> o L(D)<sub>r</sub>, e i cui L, D e r sono come definiti in precedenza;

Q è 0 o 1, a condizione che se q è 0 allora X è N-L(D)<sub>r</sub>;

20 a è 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;

$a'$  è 0,1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8; e  $a' + a < 10$ .

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita,  $a + a'$  è 4, 5, 6 o 7, più preferibilmente  $a + a'$  è 4,5 o 6 e in maniera maggiormente preferibile  $a + a'$  è 5.

**[0158]** In una forma di realizzazione preferita, se  $q$  è 1 allora  $X$  è  $C(R^1)_2$ , O, S o  $NR^1$ .

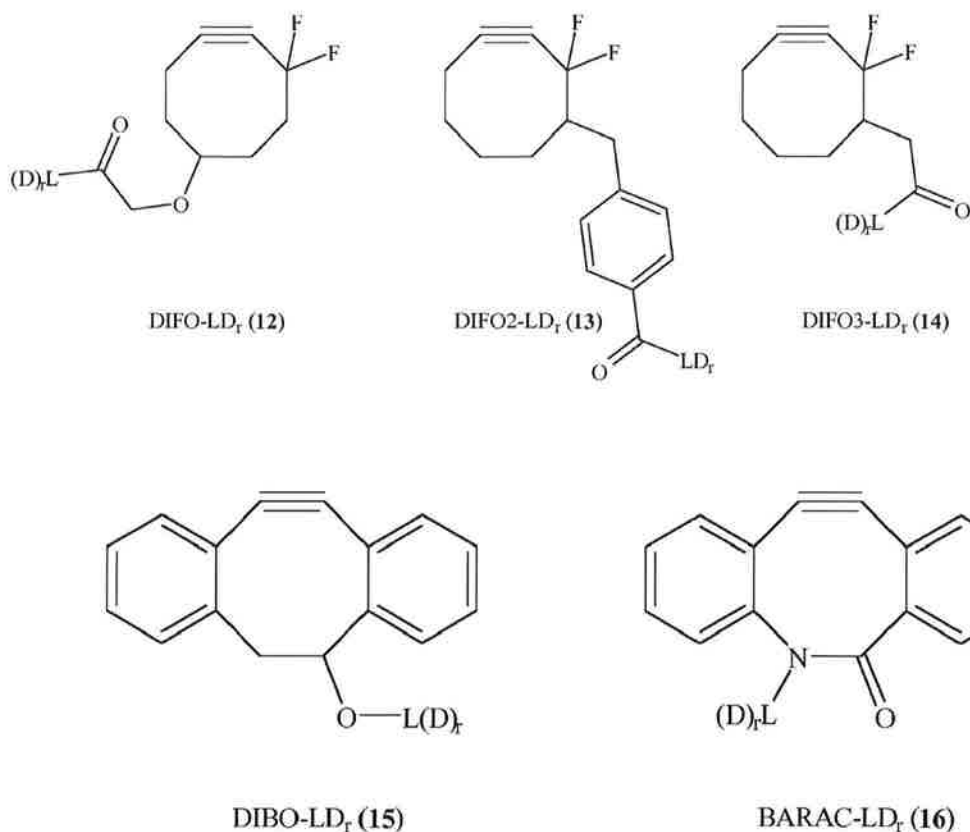
5 **[0159]** In un'altra forma di realizzazione preferita,  $a$  è 5, vale a dire detto gruppo (etero)cicloalchinile è preferibilmente un gruppo (etero)cicloottino. In un'altra forma di realizzazione preferita,  $X$  è  $C(R^2)_2$  o  $NR^2$ . Quando  $X$  è  $C(R^2)_2$  si preferisce che  $R^2$  sia idrogeno quando  $X$  è  $NR^2$ , si preferisce che  $R^2$  sia  $L(D)_r$ . In ancora un'altra forma di realizzazione preferita,  $r$  è ds 1 a 10, più preferibilmente,  $r$  è 1, 2, 3, 4, 5,6 7 o 8,  $r$  più  
10 preferibilmente è 1, 2, 3, 4,5 o 6, in maniera maggiormente preferibile  $r$  è 1, 2,3 o 4.

**[0160]** Il sostituente  $L(D)_r$  può essere presente su un atomo C nel detto gruppo (etero)cicloalchinile, o, nel caso di un gruppo eterocicloalchinile, sull'eteroatomo del detto gruppo eterocicloalchinile. Quando il gruppo (etero)cicloalchinile comprende sostituenti, per es. un cicloalchile con anello aggiunto, il sostituente  $L(D)_r$  può anche essere presente  
15 su detti sostituenti.

**[0161]** I metodi per collegare un linker L ad un gruppo (etero)cicloalchinile su una estremità e ad una molecola di interesse sull'altra estremità, allo scopo di ottenere un coniugato di linker, dipendono all'esatta natura del linker, dal gruppo (etero)cicloalchinile e dalla molecola di interesse. I metodi idonei sono noti nella tecnica.

20 **[0162]** Preferibilmente, il coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloottino, più preferibilmente un gruppo (etero)cicloottino. Le frazioni di (etero)cicloalchinile idonee sono note nella tecnica. Per esempio DIFO, DIFO2 e DIFO 3 sono divulgati nel US 2009/0068738. DIBO viene illustrato nel WO 2009/067663. DIBO può essere opzionalmente (S-DIBO) solfatato come divulgato in J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 5381.  
25 BARAC è divulgato in J. Am. Chem. Soc. 2010, 132,3688 - 3690 e nel US 2011/0207147.

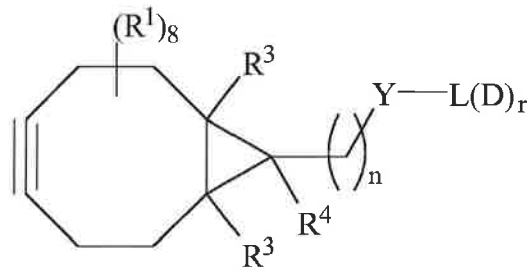
[0163] Esempi preferiti di coniugati di linker comprendenti un gruppo (etero)cicloottino sono mostrati di seguito.



[0164] Altre frazioni di cicloottino che sono note nella tecnica sono DIBAC (noto anche  
5 come ADIBO o DBCO) e BCN. DIBAC è illustrato in Chem. Commun. 2010, 46,97 - 99.  
BCN viene illustrato nel WO 2011/136645.

[0165] In una forma di realizzazione preferita, detto coniugato di linker ha la Formula  
(12); (13), (14), (15) o (16).

[0166] In un'altra forma di realizzazione preferita, detto coniugato di linker ha la Formula  
10 (17):



17

in cui:

R1, L, D e r sono come definiti in precedenza;

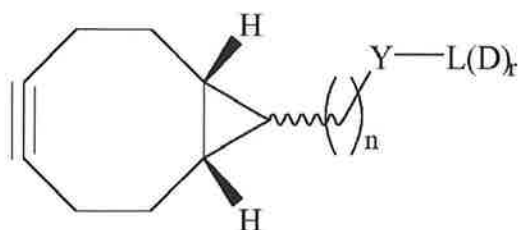
Y è O, S o NR<sup>2</sup>, in cui R<sup>2</sup> è come definito in precedenza;

R<sup>3</sup> È indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> ;

R<sup>4</sup> è selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, Y-L(D)<sub>r</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Y-L(D)<sub>r</sub>, alogeno gruppi alchile C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub>, i gruppi alchile essere opzionalmente interrotti da uno di più eteroatomi selezionati dal gruppo consistente di O, N e S, in cui i gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e i gruppi (etero)arilalchile sono indipendentemente opzionalmente sostituiti; e n è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 o 10.

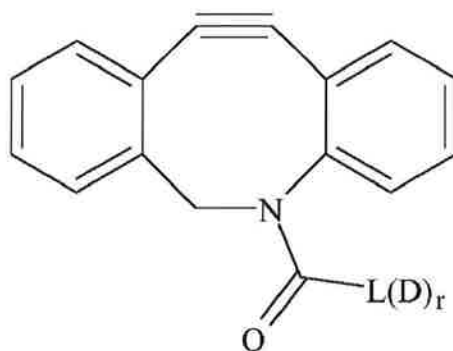
[0167] In una ulteriore forma di realizzazione preferita, R<sup>1</sup> è idrogeno. In un'altra forma di realizzazione preferita, R<sup>3</sup> è idrogeno. In un'altra forma di realizzazione preferita, n è 1 o 2. In un'altra forma di realizzazione preferita, R<sup>4</sup> è idrogeno, Y-L(D)<sub>r</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Y-L(D)<sub>r</sub>. In un'altra forma di realizzazione preferita, R<sup>2</sup> è idrogeno o L(D)<sub>r</sub>. In una ulteriore forma di realizzazione preferita, il coniugato di linker Y ha la Formula 18:

20

BCN-L(D)<sub>r</sub> **18**

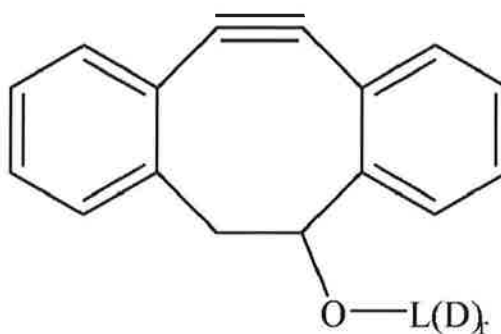
in cui Y, L, D, n e r sono come definiti in precedenza.

**[0168]** In un'altra forma di realizzazione preferita, detto coniugato di linker ha la Formula **(19)**:

**19**

in cui L, D e r sono come definiti in precedenza.

5 **[0169]** In un'altra forma di realizzazione preferita, detto coniugato di linker ha la Formula **(15)**:

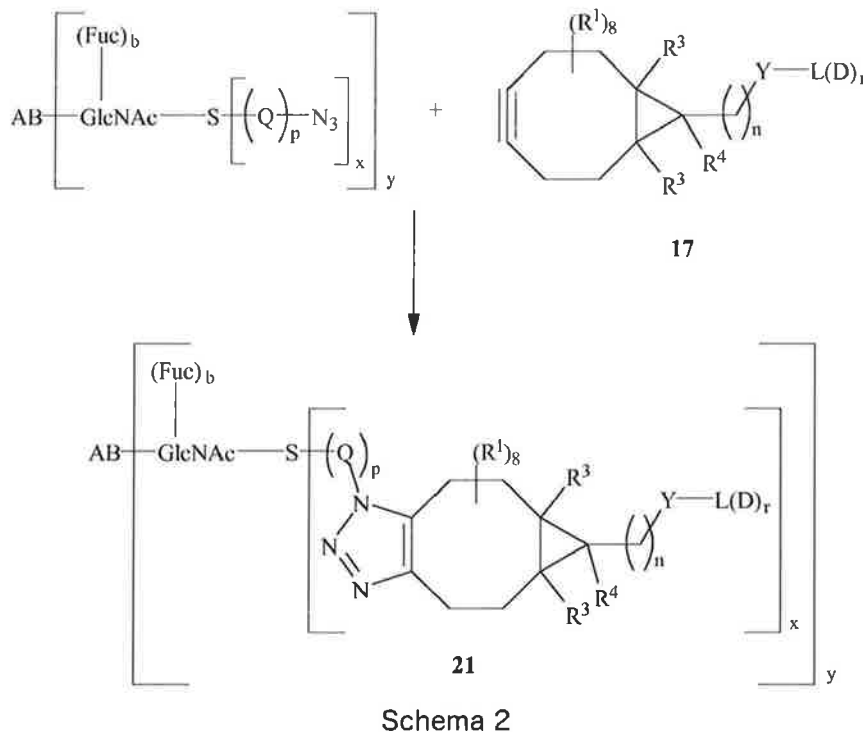
**15**

10

in cui L, D e r sono come definiti in precedenza.

[0170] La reazione di cicloaddizione di un anticorpo modificato da azoturo con un coniugato di linker comprendente un tipo preferito di gruppo cicloottino BCN-L(D)<sub>r</sub> (17) è mostrata nello schema 2.

5



in cui R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, S, Q, Y, L, D, b, p, x, n sono come definiti in precedenza, e y è 1 - 20.

20 [0171] Il valore di p e la natura di Q dipendono dallo zucchero sostituito da azoturo o derivato dello zucchero S(A)<sub>x</sub> che è presente nell'anticorpo modificato da azoturo in conformità con l'invenzione che è collegato ad un coniugato di linker. Se un azoturo in S(A)<sub>x</sub> è presente alla posizione C2, C3, o C4 dello zucchero o derivato di zucchero (al posto di un gruppo OH dello zucchero), allora p è 0.

25 Se il S(A)<sub>x</sub> è un derivato di azoturo-acetamido-zucchero, S(A)<sub>x</sub> è per es. GalNAz o

GlcNAz, allora p è 1 e Q è -N(H)C(O)CH<sub>2</sub>-. Se l'azoturo in S(A)<sub>x</sub> è presente alla posizione C6 dello zucchero o derivato di zucchero, allora p è 1 e Q è -CH<sub>2</sub>-.

**[0172]** I linker (L), indicato anche come unità di collegamento, sono ben noti nella tecnica.

In un coniugato di linker come descritto qui, L è collegato a una molecola di interesse  
5 come pure ad un gruppo B funzionale, come è stato descritto in precedenza.

**[0173]** In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo. Un coniugato di linker idoneo per la preparazione di un anticorpo modificato da azoturo è un coniugato di linker comprendente un gruppo (etero)cicloalchinile e una molecola di interesse. Numerosi metodi per il collegamento del

10 detto gruppo (etero)cicloalchinile e detta molecola di interesse a L sono noti nella tecnica.

Come sarà chiaro per un esperto della tecnica, la scelta di un metodo idoneo per il collegamento di un gruppo (etero)cicloalchinile ad una estremità di un linker e una molecola di interesse ad un'altra estremità dipende dalla natura esatta del gruppo (etero)cicloalchinile, dal linker e dalla molecola di interesse.

15 **[0174]** Un linker può avere la struttura generale F<sup>1</sup>-L(F<sup>2</sup>)<sub>r</sub>, in cui F<sup>1</sup> rappresenta un gruppo funzionale che è in grado di reagire con un gruppo F funzionale sul gruppo B funzionale come descritto in precedenza, per es. un gruppo (etero)cicloalchinile, un gruppo alchinile terminale, un'ammina primaria, un gruppo amminosi, un gruppo idrazile o un gruppo azoturo. F<sup>2</sup> rappresenta un gruppo funzionale che è in grado di reagire con un gruppo  
20 funzionale F sulla molecola di interesse.

**[0175]** Poiché più di una molecola di interesse può essere collegata ad un linker, più di un gruppo funzionale F<sup>2</sup> può essere presente su L. Come è stato descritto sopra, r è da 1 a 20, preferibilmente da 1 a 10, più preferibilmente da 1 a 8, ancor più preferibilmente 1, 2, 3, 4, 5 o 6, ancor più preferibilmente 1, 2, 3 o 4 e in maniera maggiormente preferibile, r è 1  
25 o 2.

[0176] L può essere selezionato per esempio dal gruppo consistente di gruppi lineari o ramificati alchilene C<sub>1</sub>-C<sub>200</sub>, gruppi alchenilene C<sub>2</sub>-C<sub>200</sub>, gruppi alchinilene C<sub>2</sub>-C<sub>200</sub>, gruppi cicloalchilene C<sub>3</sub>-C<sub>200</sub>, gruppi cicloalchenilene C<sub>5</sub>-C<sub>200</sub>, gruppi cicloalchinilene C<sub>8</sub>-C<sub>200</sub>, gruppi alchilarilene C<sub>7</sub>-C<sub>200</sub>, gruppi arilalchilene C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>, gruppi arilalchenilene C<sub>8</sub>-C<sub>200</sub>,  
 5 gruppi arilalchinilene C<sub>9</sub>-C<sub>200</sub>. Opzionalmente i gruppi alchilene, i gruppi alchenilene, i gruppi alchinilene, i gruppi cicloalchilene, i gruppi cicloalchenilene, i gruppi cicloalchinilene, i gruppi alchilarilene, i gruppi arilalchilene, i gruppi arilalchenilene e i gruppi arilalchinilene possono essere sostituiti, e opzionalmente detti gruppi possono essere interrotti da uno o più eteroatomi, preferibilmente da 1 a 100 eteroatomi, detti  
 10 eteroatomi essendo preferibilmente selezionati dal gruppo consistente di O, S e NR<sup>5</sup>, in cui R<sup>5</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub>. In maniera maggiormente preferibile, l'eteroatomo è O.

[0177] F, F<sup>1</sup> e F<sup>2</sup> possono essere selezionati per esempio indipendentemente dal gruppo  
 15 consistente di idrogeno, alogeno, R<sup>5</sup>, gruppi (etero)cicloalchino C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>, -CH=C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -C=CR<sup>5</sup>, -[C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>O]q-R<sup>5</sup>, in cui q è nel range da 1 a 200, -CN, -N<sub>3</sub>, -NCX, -XCN, -XR<sup>5</sup>, -N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -+N(R<sup>5</sup>)<sub>3</sub>, -C(X)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>XR<sup>5</sup>, -C(X)R<sup>5</sup>, -C(X)XR<sup>5</sup>, -S(O)R<sup>5</sup>, -S(O)2R<sup>5</sup>, -S(O)OR<sup>5</sup>, -S(O)2OR<sup>5</sup>, -S(O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -OS(O)R<sup>5</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, -OS(O)OR<sup>5</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>OR<sup>5</sup>; -P(O)(R<sup>5</sup>)(OR<sup>5</sup>), -P(O)(OR<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(OR<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -Si(R<sup>5</sup>)<sub>3</sub>, -  
 20 XC(X)R<sup>5</sup>, -XC(X)XR<sup>5</sup>, -XC(X)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>5</sup>)C(X)R<sup>5</sup>, -N(R<sup>5</sup>)C(X)XR<sup>5</sup> e -N(R<sup>5</sup>)C(X)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>, in cui X è ossigeno o zolfo e in cui R<sup>5</sup> è come definito in precedenza.

[0178] Gli esempi di unità di collegamento idonee includono (poli)etilenglicole diammine (per es. 1,8-diamino-3,6-diossaottano o equivalenti comprendenti catene di etilenglicole più lunghe), catene di ossido di polietilenglicole o polietilene, catene di  
 25 ossido di polipropilenglicole o polipropilene e 1,X-diaminoalcani in cui x è il numero di

atomi di carbonio nell'alcano.

[0179] Un'altra classe di linker idonei comprende linker clivabili. I linker clivabili sono ben noti nella tecnica. Per esempio Shabat et al., Soft Matter 2012, 6, 1073, divulga linker clivabili comprendenti frazioni autoimmolative che sono rilasciate con un innesco biologico, per es. una scissione enzimatica o un evento di ossidazione. Alcuni esempi di linker clivabili idonei sono linker di peptidi che sono clivati con specifico riconoscimento mediante una proteasi, per es. catepsina, plasmina o metalloproteasi, o linker a base di glicoside che sono clivati con specifico riconoscimento mediante una glicosidasi, per es. glucoronidasi, o sostanze nitroaromatiche che sono ridotte in aree ipossiche, scarse di ossigeno.

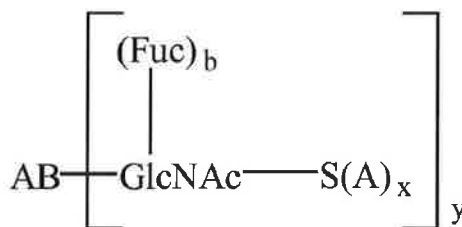
#### ***Coniugato di anticorpo***

[0180] L'invenzione si riferisce anche ad un coniugato di anticorpo ottenibile mediante il processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione. Detto processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo e le forme di realizzazione preferite del detto processo sono descritte in dettaglio in precedenza.

[0181] L'invenzione perciò si riferisce anche a un coniugato di anticorpo ottenibile mediante un processo comprendenti le fasi di:

(i) messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituito N-acetilglucosammina del nucleo (GlcNAc) con un composto della formula  $S(A)_x-P$  in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato dello zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1,

2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), per ottenere un anticorpo modificato, in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> collegato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detto anticorpo modificato è in conformità alla Formula (4):



4

in cui:

S(A)<sub>x</sub> e x sono come definiti sopra; AB rappresenta un anticorpo; GlcNAc è N-acetilglucosammina; Fuc è fucosio; b è 0 o 1; e y è da 1 a 20; e

(ii) reazione del detto anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui:

(a) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, detto coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile o un gruppo alchinile, e una, o più molecole di interesse; o

(b) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da chetone, detto coniugato di linker comprende un gruppo ammina primaria, un gruppo amminossi o un gruppo idrazinile, e una o più molecole di interesse; o

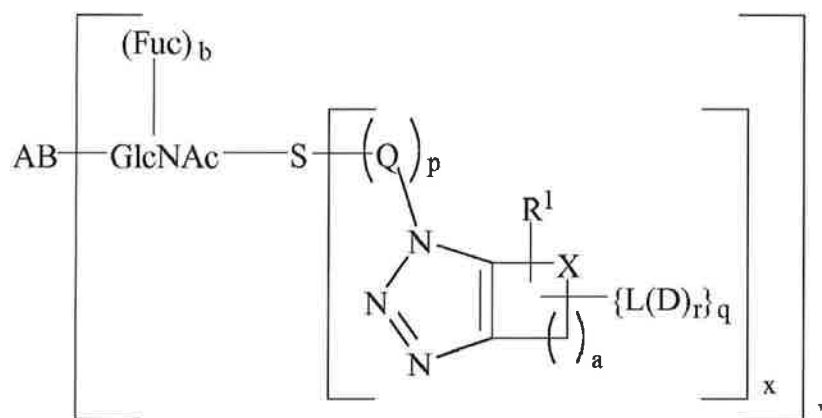
(c) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da alchino, detto coniugato di linker comprende un gruppo azoturo, e una o più molecole di interesse;



in cui una molecola di interesse (D) è coniugata all'anticorpo per mezzo di un linker (L), e in cui detta molecola di interesse è una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva.

[0182] L'invenzione ulteriormente si riferisce a un coniugato di anticorpo secondo la

5 Formula (20):

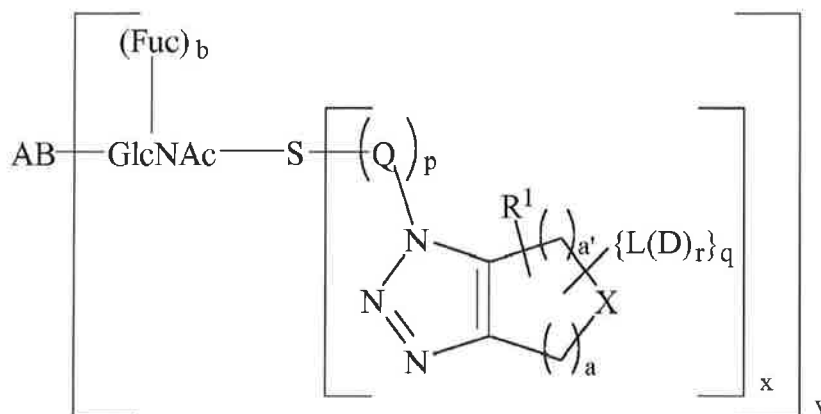


in cui AB è un anticorpo, S è uno zucchero o un derivato di zucchero, GlcNAc è N-acetilglucosammina, in cui y è 1 - 20, e in cui L, D, X, R<sup>1</sup>, Q, a, b, p, y r x e q sono come definiti in precedenza, come pure le loro forme di realizzazione preferite.

[0183] L'invenzione si riferisce ulteriormente a un coniugato di anticorpo secondo la

10 Formula (20b):

15

**20b**

in cui AB è un anticorpo, S è uno zucchero o un derivato dello zucchero, GlcNAc è N-acetilglucosammina, in cui y è 1 - 20, e in cui L, D, X, R<sup>1</sup>, Q, a, a', b, p, y r x e q sono come definiti in precedenza, come pure le loro forme di realizzazione preferite.

**[0184]** Nell'anticorpo coniugato della Formula (20) e (20b), GlcNAc è opzionalmente fucosilata (b è 0 o 1). L'anticorpo può comprendere fino a 20 sostituenti coniugati (y è 1 - 20). Preferibilmente y è 1 - 10, più preferibilmente y è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, ancor più preferibilmente y è 1, 2, 3 o 4 e in maniera maggiormente preferibile y è 1 o 2.

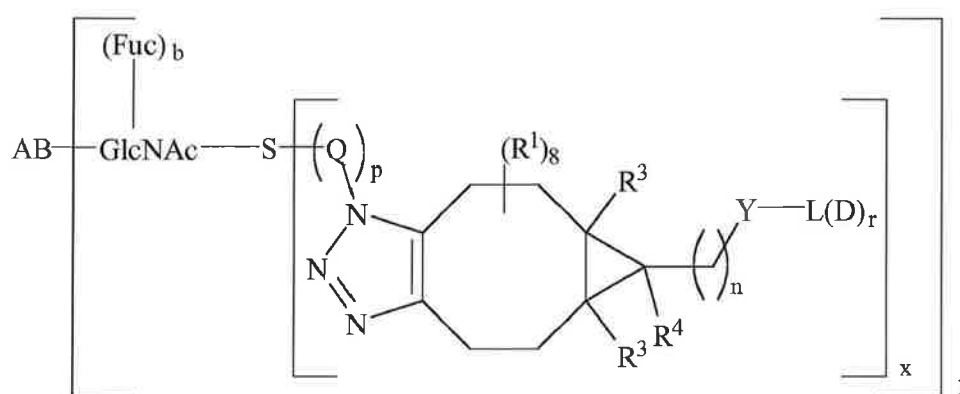
**[0185]** Le strutture preferite del derivato di zucchero (S), del linker (L), del sostituito R<sup>1</sup> e i valori preferiti per r e a sono descritti in dettaglio in precedenza.

**[0186]** Come è stato descritto in precedenza, il valore di p e la natura di Q dipendono dallo zucchero o derivato dello zucchero sostituito da azoturo S(A)<sub>x</sub> che è presente nell'anticorpo modificato da azoturo in conformità con l'invenzione, che è collegato ad un coniugato di linker. Se l'azoturo in S(A)<sub>x</sub> è presente alla posizione C2, C3, o C4 del derivato di zucchero, allora p è 0. Se il S(A) è un derivato di zucchero di azoturoacetamido, S(A)<sub>x</sub> è per es. GalNAz o GlcNAz, allora p è 1 e Q è -N(H)C(O)CH<sub>2</sub>-. Se l'azoturo in S(A)<sub>x</sub> è presente alla posizione C6 dello zucchero o derivato di zucchero, allora p è 1 e Q è -CH<sub>2</sub>-

**[0187]** Le molecole di interesse (D) sono inoltre descritte in maggiore dettaglio in precedenza. Il coniugato di anticorpo può comprendere più di una molecola di interesse. Un coniugato di anticorpo comprende più di una molecola di interesse per esempio quando è collegato a più di un coniugato di linker, quando un coniugato di linker comprende più di una molecola di interesse, o entrambi.

**[0188]** Preferibilmente, la molecola di interesse è selezionata dai gruppi consistenti di una sostanza attiva, una molecola reporter, un azoturo e un gruppo (etero)cicloalchino. Quando la molecola di interesse è una sostanza attiva, il coniugato di anticorpo può anche essere indicato come un coniugato di farmaco e anticorpo (ADC).

**[0189]** In una forma di realizzazione preferita, il coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione ha la Formula (21):

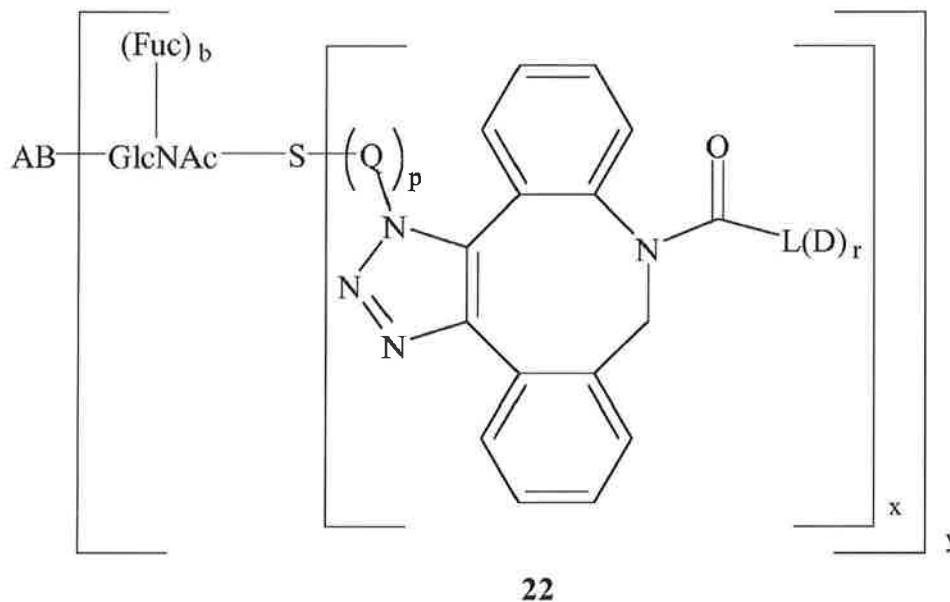


21

in cui AB, L, D, Y, S, Q, y, x, b, p, R<sup>2</sup>, GlcNAc, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, n e r sono come definiti in precedenza e in cui detta N-acetilglucosammina è opzionalmente fucosilata (b è 0 o 1).

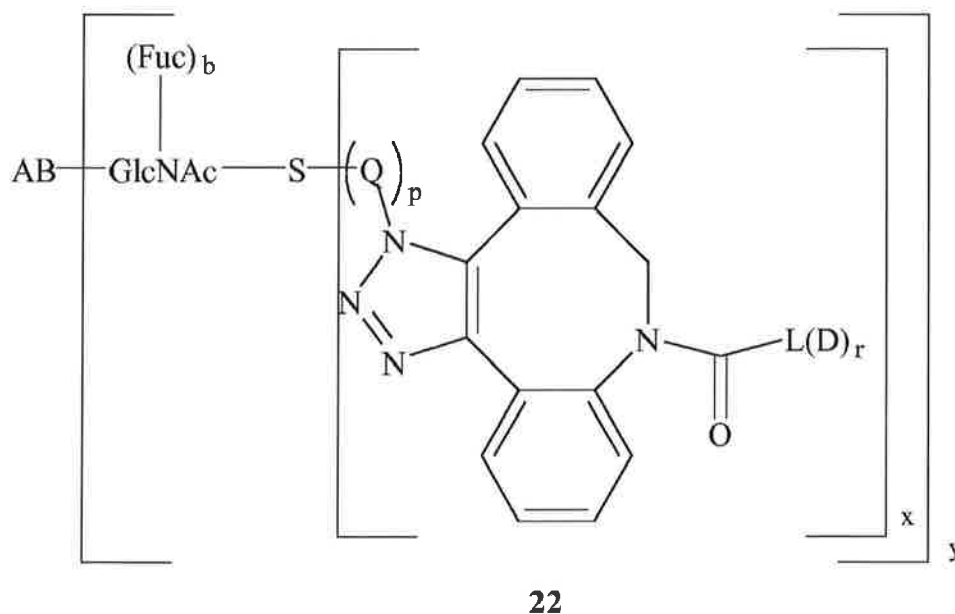
**[0190]** In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> e R<sup>4</sup> sono idrogeno e n è 1 o 2, e in una forma di realizzazione ancor più preferita x è 1.

**[0191]** In un'altra forma di realizzazione preferita, il coniugato di anticorpo ha la Formula (22):



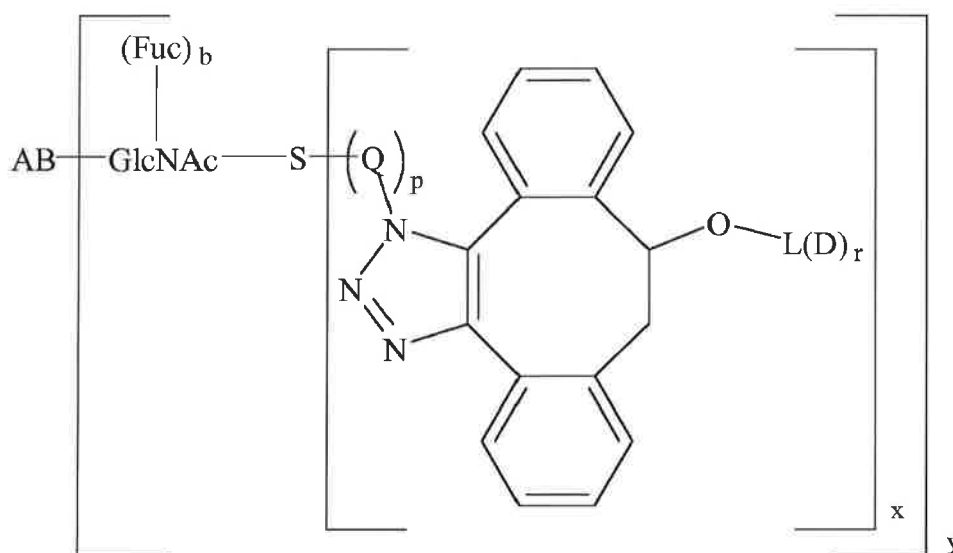
in cui AB, L, D, X, S, b, p, y x, Q e GlcNAc sono come definiti in precedenza, e in cui detta N-acetilglucosammina è opzionalmente fucosilata (b è 0 o 1).

[0192] Il coniugato di anticorpo 22 è un esempio di un composto che può esistere in molti regioisomeri. Un altro regioisomero è mostrato di seguito.



15 in cui AB, L, D, X, S, b, p, y x, Q e GlcNAc sono come definiti in precedenza, e in cui detta N-acetilglucosammina è opzionalmente fucosilata.

[0193] In un'altra forma di realizzazione preferita, il coniugato di anticorpo ha la Formula (15b):



15b

in cui AB, L, D, X, S, b, p, y, x, Q e GlcNAc sono come definiti in precedenza, e in cui  
 15 detta N-acetilglucosammina è opzionalmente fucosilata.

[0194] Nella Figura 6, è mostrata un'altra forma di realizzazione preferita del coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione. Un anticorpo comprendente due catene pesanti e due catene leggere comprende una GlcNAc del nucleo opzionalmente fucosilata su ciascuna catena pesante. Un coniugato di linker secondo la Formula (17) è collegato  
 20 all'anticorpo per mezzo di una reazione di cicloadizione del gruppo cicloottinile del detto coniugato di linker con un azoturo sull'anticorpo modificato da azoturo in conformità con l'invenzione, avente un sostituito GlcNAc-GalNAz.

[0195] L'invenzione si riferisce inoltre al coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, per l'uso come medicamento. Le forme di realizzazione preferite del detto  
 25 coniugato di anticorpo sono descritte in maggiore dettaglio in precedenza.

***Coniugato farmaco-anticorpo***

[0196] Quando la molecola di interesse in un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione è una sostanza attiva, il coniugato di anticorpo può anche essere indicato come un coniugato farmaco anticorpo (ADC). La presente invenzione si riferisce così  
5 anche ad un coniugato farmaco-anticorpo, in cui una molecola di interesse (D) è coniugata all'anticorpo per mezzo di un linker (L); in cui detta molecola di interesse (D) è una sostanza attiva; e in cui una sostanza attiva è definita come una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva.

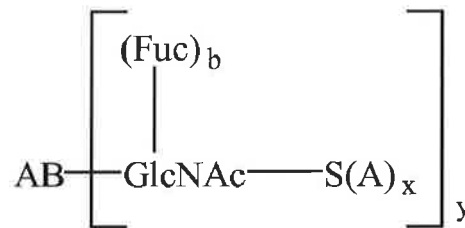
[0197] L'invenzione si riferisce anche ad un coniugato di anticorpo ottenibile mediante il  
10 processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui una molecola di interesse (D) è coniugata all'anticorpo per mezzo di un linker (L); in cui detta molecola di interesse (D) è una sostanza attiva; e in cui una sostanza attiva è definita come una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva. Detto  
15 processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo e le forme di realizzazione preferite del detto processo sono descritte in dettaglio in precedenza.

[0198] In una forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce ad un coniugato di anticorpo ottenibile mediante un processo comprendente le fasi di:

(i) messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo (GlcNAc) con un composto della formula  $S(A)_x-P$   
20 in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto sostituente di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A, in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un  
25 gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal

gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP),

per ottenere un anticorpo modificato, in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> collegato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detto anticorpo modificato è in conformità alla Formula (4):



**4**

in cui:

S(A)<sub>x</sub> e x sono come definiti sopra; AB rappresenta un anticorpo; GlcNAc è N-acetilglucosammina; Fuc è fucosio; b è 0 o 1; e y è da 1 a 20; e

(ii) reazione del detto anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui:

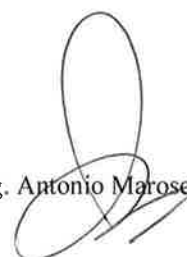
(a) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, detto coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile o un gruppo alchinile, e una o più molecole di interesse; o

(b) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da chetone, detto coniugato di linker comprende un gruppo ammina primaria, un gruppo amminossi o un gruppo idrazinile, e una o più molecole di interesse; o

(c) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da alchino, detto coniugato di linker comprende un gruppo azoturo, e una o più molecole di interesse;

in cui una molecola di interesse (D) è coniugata all'anticorpo per mezzo di un linker (L); in cui detta molecola di interesse (D) è una sostanza attiva; e in cui una sostanza attiva è definita come una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva.

- 5 [0199] Molecole di interesse (D) e linker (L) sono descritti più in dettaglio in precedenza e di seguito.
- [0200] La fase (i) e fase (ii) del processo in cui è ottenibile il coniugato farmaco-anticorpo, come pure forme di realizzazione preferite dello stesso, sono descritte in dettaglio in precedenza.
- 10 [0201] Il coniugato farmaco-anticorpo è preferibilmente ottenibile mediante il processo in conformità con l'invenzione, in cui  $x$  è 1 o 2, e più preferibilmente,  $x$  è 1. Di conseguenza, nell'anticorpo modificato in conformità alla Formula (4) come pure nel coniugato farmaco-anticorpo, ciascuna parte di zucchero S è preferibilmente collegata a 1 o 2, più preferibilmente 1, coniugati di linker L(D).
- 15 [0202] Il coniugato farmaco-anticorpo è ottenibile preferibilmente mediante il processo in conformità con l'invenzione, in cui  $y$  è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, più preferibilmente  $y$  è 1, 2, 3 o 4 e ancor più preferibilmente,  $y$  è 1 o 2. Si preferisce inoltre che  $r$  sia 1, 2, 3 o 4,  $r$  più preferibilmente è 1 o 2 e in maniera maggiormente preferibile  $r$  è 1.
- [0203] Si preferisce inoltre che nel coniugato farmaco-anticorpo in conformità con  
20 l'invenzione l'anticorpo sia un anticorpo intero, in cui  $y$  è 2. In questa forma di realizzazione, il coniugato farmaco-anticorpo può così essere collegato a 2, 4 o 8 molecole di interesse, più preferibilmente l'anticorpo è collegato a 2 o 4 molecole di interesse, e in maniera maggiormente preferibile l'anticorpo è collegato a 2 molecole di interesse.
- [0204] In una ulteriore forma di realizzazione preferita, l'anticorpo è selezionato dal  
25 gruppo consistente di anticorpi IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, più preferibilmente l'anticorpo è

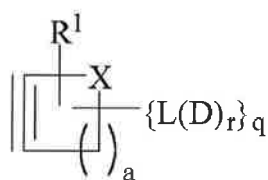


un anticorpo IgG, preferibilmente un anticorpo IgG1.

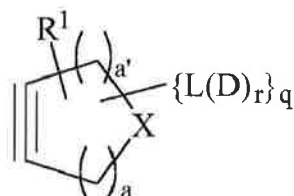
**[0205]** In un'altra forma di realizzazione del coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, l'anticorpo è un frammento di anticorpo. In questa forma di realizzazione, si preferisce che y sia 1.

5 **[0206]** In una ulteriore forma di realizzazione preferita, x è 1 e y è 1. In un'altra forma di realizzazione preferita ulteriore, x è 2 e y è 2. Si preferisce inoltre che r sia 1. In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita, x è 1, y è 1 e r è 1. In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita, x è 1, y è 2 e r è 1. In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita, x è 2, y è 2 e r è 1.

10 **[0207]** In una forma di realizzazione preferita, il coniugato farmaco-anticorpo è ottenibile mediante il processo in conformità con l'invenzione, in cui nella fase (ii) detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, e in cui detto coniugato di linker ha la Formula (11) o (11b):



11



11b

in cui:

20 D e L sono come definiti sopra;

r è 1 - 20;

R<sup>1</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi -OR<sup>5</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, gruppi alchile C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e in cui i

25 gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e gruppi

(etero)arilalchile sono opzionalmente sostituiti, in cui due sostituenti  $R^1$  possono essere collegati assieme per formare un cicloalchile con anello aggiunto o un sostituente di (etero)arene con anello aggiunto, e in cui  $R^5$  è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile  $C_1 - C_{24}$ ,  
 5 gruppi (etero)arile  $C_6-C_{24}$ , gruppi alchil(etero)arile  $C_7-C_{24}$  e gruppi (etero)arilalchile  $C_7-C_{24}$ ;

$X$  è  $C(R^1)_2$ , O, S o  $NR^2$ , in cui  $R^2$  è  $R^1$  o  $L(D)_r$ , in cui L, D e r sono come definiti in precedenza;

$Q$  è 0 o 1, a condizione che se  $q$  è 0 allora  $X$  è  $N-L(D)_r$ ;

10  $a$  è 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;

$a'$  è 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;

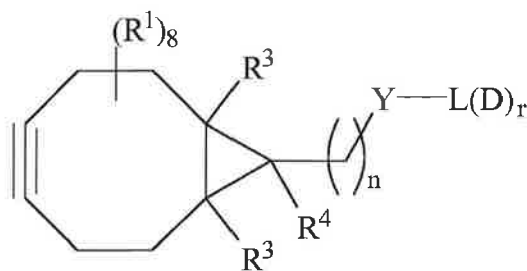
e  $a+a' < 10$ .

Preferibilmente,  $a + a'$  è 4, 5, 6 o 7, più preferibilmente  $a + a'$  è 4, 5 o 6 e in maniera maggiormente preferibile  $a + a'$  è 5.

15 **[0208]** In una ulteriore forma di realizzazione preferita, il coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione è ottenibile mediante il processo in conformità con l'invenzione, in cui nella fase (ii) detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo e in cui detto coniugato di linker ha la Formula (12); (13), (14); (15) o (16).

20 **[0209]** In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita, il coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione è ottenibile mediante il processo in conformità con l'invenzione, in cui nella fase (ii) detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo e in cui detto coniugato di linker ha la Formula (17):

25



5

17

in cui:

$R^1$ , L, D e r sono come definiti in precedenza;

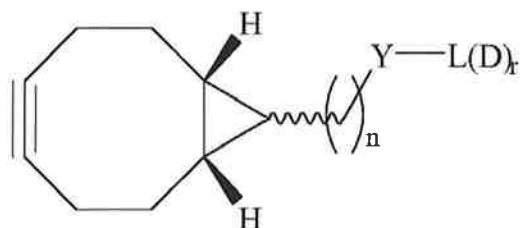
Y è O, S o  $NR^2$ , in cui  $R^2$  è come definito in precedenza;

10  $R^3$  è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile  $C_1-C_{24}$ , gruppi (etero)arile  $C_6-C_{24}$ , gruppi alchil(etero)arile  $C_7 - C_{24}$  e gruppi (etero)arilalchile  $C_7 - C_{24}$ ;

$R^4$  è selezionato dal gruppo consistente di idrogeno,  $Y-L(D)_r$ ,  $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$ , alogeno, gruppi alchile  $C_1-C_{24}$ , gruppi (etero)arile  $C_6-C_{24}$ , gruppi alchil(etero)arile  $C_7 - C_{24}$  e gruppi (etero)arilalchile  $C_7 - C_{24}$ , i gruppi alchile sono opzionalmente interrotti da uno di più eteroatomi selezionati dal gruppo consistente di O, N e S, in cui i gruppi alchile, gruppi (etero)arile, gruppi alchil(etero)arile e gruppi (etero)arilalchile sono indipendentemente opzionalmente sostituiti; e n è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 o 10.

20 **[0210]** In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita,  $R^1$  è idrogeno. In un'altra forma di realizzazione preferita,  $R^3$  è idrogeno. In un'altra forma di realizzazione preferita, n è 1 o 2. In un'altra forma di realizzazione preferita,  $R^4$  è idrogeno,  $Y-L(D)_r$  o  $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$ . In un'altra forma di realizzazione preferita,  $R^2$  è idrogeno o  $L(D)_r$ . In una ulteriore forma di realizzazione preferita, il coniugato di linker ha la Formula **18**:

25

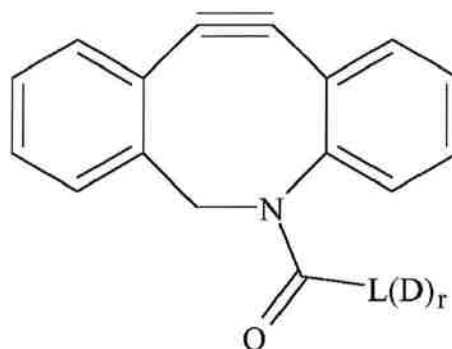


5

BCN-L(D)<sub>r</sub> **18**

in cui Y, L, D, n e r sono come definiti in precedenza.

[0211] In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita, il coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione è ottenibile mediante il processo in conformità con l'invenzione, in cui nella fase (ii) detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da  
10 azoturo e in cui detto coniugato di linker ha la Formula (19):



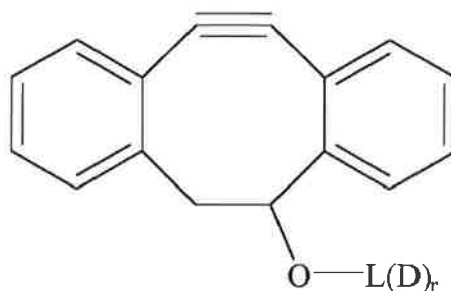
15

**19**

in cui L, D e r sono come definiti in precedenza.

[0212] In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita, il coniugato farmaco-anticorpo  
20 in conformità con l'invenzione è ottenibile mediante il processo in conformità con l'invenzione, in cui nella fase (ii) detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo e in cui detto coniugato di linker ha la Formula (15):

25



5

15

in cui L, D e r sono come definiti in precedenza.

[0213] Gli esperimenti di efficacia *in vivo* mostrano che il coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione ha un effetto sul volume tumorale.

10 [0214] L'invenzione si riferisce ulteriormente ad un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui la molecola di interesse è una sostanza attiva, per l'uso come medicamento.

15 [0215] L'invenzione si riferisce anche all'uso di un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui la molecola di interesse è una sostanza attiva, per l'uso nel trattamento del cancro.

[0216] L'invenzione si riferisce ulteriormente ad un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui la molecola di interesse è una sostanza attiva, per l'uso nel trattamento del cancro al seno, più preferibilmente per l'uso nel trattamento del cancro al seno positivo a HER2.

20 [0217] L'invenzione si riferisce anche ad un metodo di trattamento del cancro mediante la somministrazione di un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione.

[0218] L'invenzione si riferisce anche ad un metodo di trattamento di cancro al seno mediante la somministrazione di un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione.

25 [0219] L'invenzione si riferisce anche ad un metodo di trattamento del cancro al seno

positivo a HER2, mediante la somministrazione di un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione.

[0220] In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo nel detto coniugato farmaco-anticorpo è trastuzumab. In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la molecola di  
5 interesse è una citotossina, preferibilmente maitansinoide, auristatina E, auristatina F, duocarmicina o pirrolobenzodiazepina.

[0221] Nel coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, la molecola di interesse è una sostanza attiva. Come è stato descritto sopra, una sostanza attiva è una sostanza farmacologica e/o biologica, vale a dire una sostanza che è biologicamente e/o  
10 farmaceuticamente attiva, per esempio un farmaco o un profarmaco, un agente diagnostico, una proteina, un peptide, un aminoacido, un glicano, un lipide, una vitamina, uno steroide, un polietilenglicole, un nucleotide, un nucleoside, un polinucleotide, RNA o DNA. Gli esempi di marcatori di peptide idonei includono peptidi di penetrazione cellulare di tipo lattoferrina o poliarginina umana. Un esempio di un glicano idoneo è  
15 oligomannosio.

[0222] In una forma di realizzazione preferita, la sostanza attiva è selezionata dal gruppo consistente di farmaci e profarmaci. Più preferibilmente, la sostanza attiva è selezionata dal gruppo consistente di composti farmaceuticamente attivi, in particolare composti da basso a medio peso molecolare (per es. da circa 200 a circa 1500 Da, preferibilmente da  
20 circa 300 a circa 1000 Da), come ad esempio citotossine, agenti antivirali, agenti antibatterici, peptidi e oligonucleotidi. Gli esempi di citotossine includono camptotecina, staurosporina, doxorubicina, daunorubicina, colchicina, metotrexato, taxani, calicheamicine, duocarmicine, maitansine e maitansinoidi (vale a dire derivati di maitansine), auristatine, tubulisina M, criptoficina o pirrolobenzodiazepine (PBD). Gli  
25 esempi di auristatine includono dolastatina 10, auristatina F, monometile auristatina F

(MMAF), auristatina E, monometile auristatina E (MMAE), auristatina PE, auristatina TP e auristatina AQ. Gli esempi di maitansine e maitansinoidi includono mertansine e ansamitocina.

**[0223]** In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo nel detto coniugato di anticorpo  
5 è un anticorpo che lega l'antigene del cancro. Esempi di un anticorpo che lega l'antigene del cancro includono trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, rituximab, bevacizumab, girentuximab, gemtuzumab, inotuzumab, alemtuzumab, tositumumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, elotuzumab, zanolimumab, obinutuzumab, necitumumab, farletuzumab, vedolizumab, tabalumab, itolizumab, ocrelizumab, epratuzumab,  
10 mepolizumab, reslizumab, sarilumab e ramicurumab.

**[0224]** Perciò, l'invenzione si riferisce ad un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui l'anticorpo è un anticorpo che lega l'antigene del cancro e in cui la molecola di interesse è una citotossina, per l'uso come medicamento. L'invenzione si riferisce anche ad un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui  
15 l'anticorpo è un anticorpo che lega l'antigene del cancro e in cui la molecola di interesse è una citotossina, per l'uso nel trattamento del cancro. Inoltre, l'invenzione si riferisce a un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui l'anticorpo è un anticorpo che lega l'antigene del cancro e in cui la molecola di interesse è una citotossina, per l'uso nel trattamento del cancro al seno, e più preferibilmente per l'uso nel trattamento di cancro  
20 al seno positivo a HER2.

**[0225]** In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce a un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui il coniugato di anticorpo è trastuzumab-(MMAF)<sub>2</sub>, trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)<sub>2</sub>, trastuzumab(maitansinoide)<sub>2</sub> o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub>, per l'uso nel trattamento del cancro. In  
25 un'ulteriore forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce ad un coniugato di

anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui il coniugato di anticorpo è trastuzumab-(MMAF)<sub>2</sub>, trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)<sub>2</sub>, trastuzumab(maitansinoide)<sub>2</sub> o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub>, per l'uso nel trattamento del cancro al seno, più preferibilmente per l'uso nel trattamento del cancro al seno positivo a HER2.

5 [0226] In aggiunta, l'invenzione si riferisce ad un metodo per trattare il cancro con la somministrazione di un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione. L'invenzione si riferisce anche a un metodo di trattamento del cancro al seno mediante la somministrazione di un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione. L'invenzione si riferisce ulteriormente ad un metodo di trattamento del cancro al seno  
10 positivo a HER2, mediante la somministrazione di un coniugato farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione. Le forme di realizzazione preferite dell'anticorpo e della molecola di interesse sono descritte in precedenza.

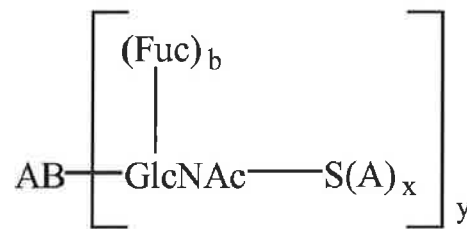
***Processo per la preparazione di un coniugato farmaco-anticorpo***

[0227] L'invenzione si riferisce anche ad un processo per la preparazione di un coniugato  
15 farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione, comprendente le fasi di:

(i) messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosamina del nucleo (GlcNAc) con un composto della formula S(A)<sub>x</sub>-P in presenza di un catalizzatore idoneo, in cui detto sostituito di N-acetilglucosamina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto  
20 catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui S(A)<sub>x</sub> è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2,3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di  
25 guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP),

per ottenere un anticorpo modificato, in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detto anticorpo modificato è in conformità alla Formula

5 (4):



10

4

in cui:

S(A)<sub>x</sub> e x sono come definiti sopra; AB rappresenta un anticorpo; GlcNAc è N-acetilglucosammina; Fuc è fucosio; b è 0 o 1; e y è da 1 a 20; e

(ii) reazione del detto anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui:

15

(a) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, detto coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile o un gruppo alchinile, e una o più molecole di interesse; o

20

(b) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da chetone, detto coniugato di linker comprende un gruppo di ammina primaria, un gruppo amminossi o un gruppo idrazinile, e una o più molecole di interesse; o

25

(c) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da alchino, detto coniugato di linker comprende un gruppo azoturo, e una o più molecole di interesse,



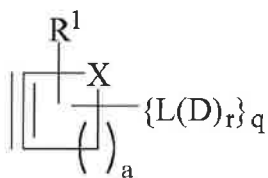
in cui una molecola di interesse (D) è coniugata all'anticorpo per mezzo di un linker (L); in cui detta molecola di interesse è una sostanza attiva; e in cui una sostanza attiva è definita come una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva.

5 [0228] In una forma di realizzazione preferita, detto catalizzatore è un catalizzatore comprendente un dominio catalitico mutante da una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi, preferibilmente selezionato dal gruppo consistente di GalT Y289L, GalT Y289N e GalT Y289I. In un'altra forma di realizzazione preferita, detto catalizzatore è un catalizzatore comprendente un dominio catalitico mutante da una  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi,  
10 selezionato dal gruppo consistente di GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I e GalT Y289A, preferibilmente selezionato dal gruppo consistente di GalT Y289F e GalT Y289M.

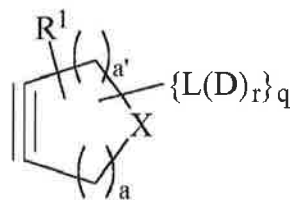
[0229] In un'altra forma di realizzazione preferita, x è 1, 2,3 o 4, preferibilmente x è 1 o 2, x più preferibilmente è 1. In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, y è 1, 2, 3,  
15 4, 5, 6,7 o 8, preferibilmente y è 1, 2,3 o 4 e più preferibilmente y è 1 o 2.

[0230] In una forma di realizzazione preferita specifica, l'anticorpo è un anticorpo intero e y è 2, e in un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo è un frammento di anticorpo e y è 1.

[0231] In una forma di realizzazione preferita del processo per la preparazione di un  
20 coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, e detto coniugato di linker ha la Formula (11) o (11b):



11



11b

5

in cui:

D e L sono come definiti sopra;

r è 1 - 20;

R<sup>1</sup> è selezionato indipendentemente dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, -OR<sup>5</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, gruppi alchile C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e in cui i gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e i gruppi (etero)arilalchile sono opzionalmente sostituiti, in cui due sostituenti R<sup>1</sup> possono essere collegati assieme per formare un cicloalchile con anello aggiunto o un sostituito (etero)arene con anello aggiunto, e in cui R<sup>5</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>;

X è C(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>, O, S o NR<sup>2</sup>, in cui R<sup>2</sup> è R<sup>1</sup> o L(D)<sub>r</sub> in cui L, D e r sono come definiti in precedenza;

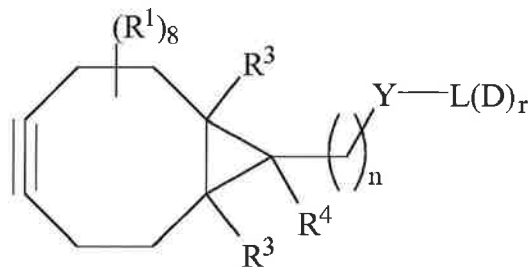
Q è 0 o 1, a condizione che se q è 0 allora X è N-L(D)<sub>r</sub>; e un è 0,1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8; e a è 0,1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8; e a+a' < 10.

Preferibilmente, a + a' è 4, 5,6 o 7, più preferibilmente a + a' è 4, 5 o 6 e in maniera maggiormente preferibile a + a' è 5.

[0232] In una ulteriore forma di realizzazione preferita del processo in conformità con

l'invenzione, detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, e detto coniugato di linker ha la Formula (12); (13), (14); (15) o (16).

[0233] In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita del processo in conformità con l'invenzione, detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, e detto  
5 coniugato di linker ha la Formula (17):



10

17

in cui:

$R^1$ , L, D e r sono come definiti in precedenza;

Y è O, S o  $NR^2$ , in cui  $R^2$  è come definito in precedenza;

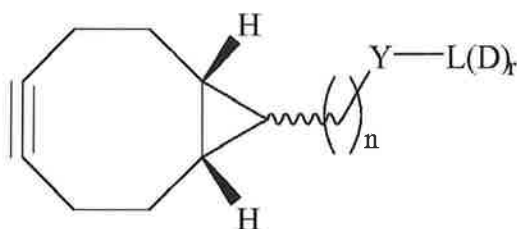
15  $R^3$  è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile  $C_1-C_{24}$ , gruppi (etero)arile  $C_6-C_{24}$ , gruppi alchil(etero)arile  $C_7 - C_{24}$  e gruppi (etero)arilalchile  $C_7 - C_{24}$ ;

$R^4$  è selezionato dal gruppo consistente di idrogeno,  $Y-L(D)_r$ ,  $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$ , alogeno, gruppi alchile  $C_1-C_{24}$ , gruppi (etero)arile  $C_6-C_{24}$ , gruppi alchil(etero)arile  
20  $C_7 - C_{24}$  e gruppi (etero)arilalchile  $C_7 - C_{24}$ , i gruppi alchile essendo opzionalmente interrotti da uno di più eteroatomi selezionati dal gruppo consistente di O, N e S, in cui i gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e gruppi (etero)arilalchile sono indipendentemente opzionalmente sostituiti; e n è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 o 10.

25 [0234] In una ulteriore forma di realizzazione preferita del processo in conformità con

l'invenzione,  $R^1$  è idrogeno. In un'altra forma di realizzazione preferita,  $R^3$  è idrogeno. In un'altra forma di realizzazione preferita,  $n$  è 1 o 2. In un'altra forma di realizzazione preferita,  $R^4$  è idrogeno,  $Y-L(D)_r$  o  $-(CH_2)_n-Y-L(D)_r$ . In un'altra forma di realizzazione preferita,  $R^2$  è idrogeno o  $L(D)_r$ . In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, il

5 coniugato di linker ha la Formula **18**:



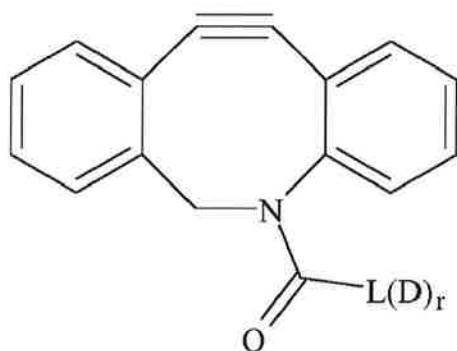
10

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

in cui  $Y$ ,  $L$ ,  $D$ ,  $n$  e  $r$  sono come definiti in precedenza.

[0235] In un'altra ulteriore forma di realizzazione preferita del processo in conformità con l'invenzione, detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, e detto

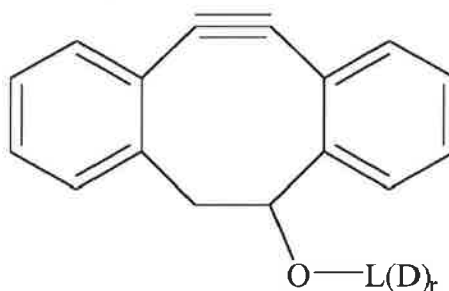
15 coniugato di linker ha la Formula (19):

**19**

in cui  $L$ ,  $D$  e  $r$  sono come definiti in precedenza.

[0236] In un'altra forma di realizzazione preferita del processo in conformità con l'invenzione, detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo, e detto coniugato di linker ha la Formula (15):

5



15

10 in cui L, D e r sono come definiti in precedenza.

*Anticorpo modificato, coniugato di anticorpo e coniugato di farmaco-anticorpo in conformità con l'invenzione*

[0237] L'anticorpo modificato, il coniugato di anticorpo, il coniugato farmaco-anticorpo e i processi per la preparazione degli stessi in conformità con l'invenzione hanno molti vantaggi rispetto agli anticorpi modificati, coniugati di anticorpo e processi per la loro preparazione noti nella tecnica.

[0238] Come è stato descritto in precedenza, i processi noti per la coniugazione di una tossina di linker agli anticorpi devono ancora essere migliorati, non soltanto in termini di controllo sia della specificità di sito che della stechiometria, ma anche in termini di efficienza del processo di coniugazione. Malgrado la capacità degli ADC di stabilirsi nei loro bersagli, la quantità di farmaco stimata penetrare nelle cellule tumorali è tipicamente <2% di una dose somministrata. Questo problema è amplificato dai risultati di coniugazione imprevedibili degli ADC noti nella tecnica. E' importante evitare anticorpi sottoconiugati, che diminuiscono la potenza, come pure specie altamente coniugate, che possono avere emivite di circolazione marcatamente diminuite, legame compromesso alla

25

proteina bersaglio, e tossicità aumentata.

[0239] Per i coniugati farmaco-anticorpo, una misura per il caricamento di molecole di interesse (per es. farmaci, sostanze attive) sull'anticorpo è il cosiddetto rapporto tra farmaco e anticorpo (DAR), che fornisce il numero medio di molecole di sostanza attiva per anticorpo, calcolato a partire da una distribuzione statistica. Il valore massimo teorico di DAR per un certo tipo di ADC è uguale al numero di siti di ancoraggio. Come è stato descritto in precedenza, i processi per la preparazione di ADC noti da dalla tecnica anteriore comportano generalmente un prodotto comprendente una miscela di coniugati di anticorpo con un numero variabile di molecole di interesse presenti in ciascun coniugato di anticorpo, e in un DAR con una deviazione standard elevata.

[0240] Uno dei vantaggi degli anticorpi modificati e dei coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione è che questi anticorpi e coniugati di anticorpo sono omogenei, sia nella specificità di sito che nella stechiometria. L'invenzione perciò si riferisce anche a un coniugato farmaco-anticorpo, in cui il coniugato farmaco-anticorpo è omogeneo. È ulteriormente preferibile che il coniugato farmaco-anticorpo sia omogeneo nella specificità di sito e stechiometria. Si preferisce anche che il coniugato farmaco-anticorpo venga ottenuto con un rapporto del farmaco rispetto all'anticorpo (DAR) vicino al valore teorico, e con bassa deviazione standard.

[0241] In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo modificato e il coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione sono omogenei, nella specificità di sito e nella stechiometria. Qui, un anticorpo o un coniugato di anticorpo è considerato omogeneo quando la coniugazione è effettuata soltanto in un sito predeterminato e con rapporto farmaco-anticorpo predeterminato. Un coniugato di anticorpo è eterogeneo quando la coniugazione dell'anticorpo ha luogo in siti differenti nell'anticorpo, portando ad una miscela di prodotti con rapporto farmaco-anticorpo imprevedibile. Nel secondo caso, il

rapporto farmaco-anticorpo sarà una media del gruppo intero di coniugati farmaco-anticorpo.

[0242] In un'altra forma di realizzazione preferita, il coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione ha un DAR che si trova entro il 10 % del suo valore teorico.

5 [0243] Detti anticorpi modificati e coniugati di anticorpo sono ottenuti con un DAR molto vicino al valore teorico, e con una deviazione standard molto bassa. Questo significa anche che i coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione comportano un prodotto più costante per i test preclinici.

10 [0244] Un altro vantaggio dei processi e degli anticorpi in conformità con l'invenzione comporta la riduzione di rifiuti nella fabbricazione, migliorando pertanto il costo dei prodotti delle aziende.

[0245] In aggiunta, il processo per la preparazione di un anticorpo modificato e per la preparazione di un anticorpo coniugato in conformità con l'invenzione procede molto efficacemente. Le cinetiche di reazione sono molto favorevoli, comportando una  
15 conversione quasi completa in un periodo di tempo relativamente breve, in particolare rispetto ai processi noti nella tecnica, e non si formano o si formano appena dei prodotti secondari.

[0246] Inoltre, quando un anticorpo modificato da azoturo in conformità con l'invenzione è accoppiato ad un coniugato di linker comprendente un gruppo alchilile, o quando un  
20 anticorpo modificato da alchino in conformità con l'invenzione è accoppiato ad un coniugato di linker comprendente una frazione di azoturo, per mezzo di una reazione di cicloaddizione, i triazoli risultanti non sono suscettibili di idrolisi o altri percorsi di degradazione. Quando un anticorpo modificato da chetone in conformità con l'invenzione è accoppiato ad un coniugato di linker comprendente un'idrossilammina o un'idrazina, le  
25 ossime o gli idrazoni risultanti sono inoltre relativamente inerti a condizioni neutre.

[0247] I vantaggi addizionali sono così la stabilità dei coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione, come pure il processo semplice e generalmente applicabile per l'introduzione di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e/o un gruppo alchinile in uno degli anticorpi.

5 [0248] Come descritto in precedenza, i coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione hanno diversi vantaggi rispetto ai coniugati di anticorpo noti nella tecnica anteriore. Uno dei vantaggi degli anticorpi modificati, i coniugati di anticorpo e il processo per la loro preparazione in conformità con l'invenzione è che questi anticorpi e coniugati di anticorpo sono omogenei, sia nella specificità di sito che nella stechiometria. Gli  
10 anticorpi modificati e i coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione sono ottenuti con un DAR molto vicino al valore teorico, e con una deviazione standard molto bassa. Questo significa anche che i coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione comportano un prodotto più costante per i test preclinici.

[0249] Le proprietà di un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione sono  
15 modulate mediante progettazione, espressione, e lavorazione nei coniugati farmaco-anticorpo degli anticorpi monoclonali con differenti profili di glicosilazione. Le proprietà che possono essere modulate sono per es. attività anti-tumorale, la dose massima tollerata, la farmacocinetica come la clearance del plasma, l'indice terapeutico, in termini di efficacia e tossicità, l'attenuazione del farmaco, la stabilità dell'attacco del farmaco e del  
20 rilascio del farmaco dopo il raggiungimento del bersaglio. In particolare, esiste una correlazione fra posizionamento del farmaco e l'efficacia *in vivo* di ADC.

[0250] Gli esperimenti *in vivo* e *in vitro* mostrano che il coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione ha un effetto citotossico sulle cellule che esprimono HER2. Gli esperimenti *in vitro* dimostrano che i coniugati farmaco-anticorpo in conformità con  
25 l'invenzione sono in grado di uccidere selettivamente la linea cellulare che esprime HER2



rispetto alla linea cellulare negativa a HER2, come riassunto nelle Figure 24 - 26. L'esperimento *in vivo* dimostra che una dose singola di molti dei coniugati di anticorpo secondo l'invenzione è in grado di eliminare un tumore che esprime HER2 da un xenotrapianto di topo, come risulta chiaro dalla Figura 29 e 30. In aggiunta, è dimostrato che i coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione hanno un profilo farmacocinetico identico all'anticorpo nativo trastuzumab, come riassunto nella Figura 27.

5 che i coniugati di anticorpo in conformità con l'invenzione hanno un profilo farmacocinetico identico all'anticorpo nativo trastuzumab, come riassunto nella Figura 27.

[0251] L'invenzione si riferisce perciò ulteriormente ad un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, per l'uso come medicamento. L'invenzione si riferisce anche ad un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, per l'uso nel trattamento del

10 cancro. L'invenzione si riferisce ulteriormente ad un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, per l'uso nel trattamento del cancro al seno, più preferibilmente per l'uso nel trattamento del cancro al seno positivo a HER2.

[0252] In una forma di realizzazione preferita, la molecola di interesse nel detto coniugato di anticorpo è una sostanza attiva, vale a dire una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva. Preferibilmente, la sostanza attiva è una citotossina. Gli esempi di citotossine includono camptotecina, doxorubicina, daunorubicina, taxani, calicheamicine, duocarmicine, maitansine e maitansinoidi (vale a dire derivati di maitansina), auristatine o pirrolobenzodiazepine (PBD esempi di citotossine includono camptotecina, staurosporina, doxorubicina, daunorubicina, colchicina, metotrexato,

20 taxani, calicheamicine, duocarmicine, maitansine e maitansinoidi (vale a dire derivati di maitansine), auristatine, tubulisina M, criptoficina o pirrolobenzodiazepine (PBD). Gli esempi di auristatine includono dolastatina 10, auristatina F, monometile auristatina F (MMAF), auristatina E, monometile auristatina E (MMAE), auristatina PE, auristatina TP e auristatina AQ. Gli esempi di maitansine e maitansinoidi includono mertansine e

25 ansamitocina.

[0253] In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo nel detto coniugato di anticorpo è un anticorpo che lega l'antigene del cancro. Gli esempi di un anticorpo che lega l'antigene del cancro includono trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, rituximab, bevacizumab, girentuximab, gemtuzumab, inotuzumab, alemtuzumab, tositumumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, elotuzumab, zanolimumab, obinutuzumab, necitumumab, farletuzumab, vedolizumab, tabalumab, itolizumab, ocrelizumab, epratuzumab, mepolizumab, reslizumab, sarilumab e ramicurumab.

[0254] Perciò, in una forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce ad un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui l'anticorpo è un anticorpo che lega l'antigene del cancro e in cui la molecola di interesse è una citotossina, per l'uso come medicamento. In un'altra forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce ad un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui l'anticorpo è un anticorpo che lega l'antigene del cancro e in cui la molecola di interesse è una citotossina, per l'uso nel trattamento del cancro. In un'altra forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce ad un coniugato di anticorpo in conformità con l'invenzione, in cui l'anticorpo è un anticorpo che lega l'antigene del cancro e in cui la molecola di interesse è una citotossina, per l'uso nel trattamento del cancro al seno, e più preferibilmente per l'uso nel trattamento del cancro al seno positivo a HER2.

[0255] In una ulteriore forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce a un anticorpo coniugato in conformità con l'invenzione, in cui l'anticorpo coniugato è trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)<sub>2</sub> o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub>, per l'uso nel trattamento del cancro. In una ulteriore forma di realizzazione preferita, l'invenzione si riferisce ad un anticorpo coniugato in conformità con l'invenzione, in cui l'anticorpo coniugato è trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)<sub>2</sub> o trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub>, per l'uso nel trattamento del cancro al seno, più preferibilmente per l'uso nel trattamento



**Esempi****Sintesi***Esempi 1 - 4: sintesi di BCN-doxorubicina 28a e 28b*

[0260] Lo schema di reazione della sintesi di coniugato linker BCN-doxorubicina 28a a partire da BCN-OSu 23, come effettuato negli Esempi 1 - 4, è mostrato in Figura 7.

*Esempio 1. Sintesi di BCN-ammina 24*

[0261] Ad una soluzione di 2,2'-(etilenediossi)bis(etilammina) (11,78 mL, 80,5 mmol) in DCM (200 mL) è stato aggiunto BCN-OSu 23 (7,82 g, 26,8 mmol) in DCM (100 mL) goccia a goccia per 3 ore.

Dopo l'aggiunta completa, la miscela è stata mescolata per 10 min seguita da lavaggio con NH<sub>4</sub>Cl acquoso saturo (3 × 200 mL). Lo strato organico è stato essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato sotto vuoto. La cromatografia a colonna Flash (DCM:MeOH 99:1-93:7 + 1% Et<sub>3</sub>N) ha fornito il prodotto 24 (5,95 g, 54,7 mmol, 68%). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,38 (s; 1H), 4.13 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 3,59 (s; 4H), 3,56-3,50 (m, 4H), 3,35 (q, J= 5,1 Hz, 2H), 2,88 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 2,32 (br s, 2H), 2,27-2,15 (m; 6H), 1,62-1,42 (m; 2H), 1.33 (qn, J = 8,7 Hz, 1H), 0,97-0,85 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 156,4, 98,3, 68,7 (2C), 62,2, 45,5, 40,3, 40,2, 28,6, 20,9, 19,6, 17,3. HRMS (ESI+) calcolato per C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na<sup>+</sup>) 347,1947, trovato 347.1952.

*Esempio 2. sintesi di BCN-biotina 25*

[0262] Ad una soluzione di derivato BCN 24 (0,80 g, 2,47 mmol) in DCM (25 mL) sono stati aggiunti biotina-OSu (0,93 g, 2,71 mmol) e Et<sub>3</sub>N (0,86 mL, 6,16 mmol). La miscela di reazione è stata agitata per 5 ore ed è stato aggiunto NaHCO<sub>3</sub> acquoso saturo successivo (20 mL). Lo strato organico è stato lavato con NaHCO<sub>3</sub> acquoso saturo (2 × 20 mL), essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato a pressione ridotta. La cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-92:8) ha fornito BCN biotina 25 (1,14 g, 2,1 mmol, 84%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.57 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.52-4.48 (m, 1H), 4.33-4.30 (m, 1H), 4.16 (d, J = 8 Hz, 2H), 3.62 (s; 4H), 3.57 (t, J = 5.2 Hz, 4H), 3.45 (q, J = 5.2 Hz, 2H), 3.40-3.36 (m, 2H), 3.17-3.12 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 8,4,8 Hz, 1H), 2.72 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 2.33-2.18 (m; 8H), 1.88 (br s, 1H), 1.80-1.57 (m; 6H), 1.49-1.33 (m, 3H), 0.95 (t, J = 9,6 Hz, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 172,9, 163,6, 156,4, 98,3, 69,6, 61,3, 59,7, 55,2, 40,3, 40,0, 38,7, 35,5, 28,6, 27,8, 27,6, 25,1, 21,0, 19,7,17,3. HRMS (ESI+) calcolato per C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S (M+H<sup>+</sup>) 551,2903, trovato 551,2911.

*Esempio 3. sintesi di estere attivato 26*

[0263] BCN-ammina **24** (3,6 g, 11,1 mmol) è stata disciolta in DCM (150 mL) e sono stati aggiunti anidride glutarica (1,39 g, 12,2 mmol) e Et<sub>3</sub>N (4.61 mL, 33,3 mmol). La miscela di reazione è stata agitata per 2 ore seguita dall'aggiunta di DSC (4,3 g, 16,7 mmol). Dopo 2 ore, la reazione è stata estinta con H<sub>2</sub>O (100 mL) e lo strato organico è stato lavato con acqua (2 × 150 mL), essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato sotto vuoto. La cromatografia a colonna flash (EtOAc:MeOH 99:1-94:6) ha prodotto estere attivato **26** (4,63 g, 8,6 mmol, 78%).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.14 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 3.59 (s, 4H), 3.57-3.52 (m, 4H), 3.44 (q, J = 5,1 Hz, 2H), 3.35 (q, J = 4,8 Hz, 2H). 2.83 (br s, 4H), 2.67 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2.33-2.16 (m, 7H), 2.08 (qn, J = 6.9 Hz, 2H), 1.65-1.49 (m, 2H), 1.33 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 0.97-0.87 (m, 2H).

LRMS (ESI+) calcolato per C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> (M+H<sup>+</sup>) 536,26, trovato 536.0.

*Esempio 4. sintesi di coniugato BCN-doxorubicina 28a*

[0264] Ad una soluzione di estere attivato **26** (5 mg, 0,0093 mmol) e doxorubicina.HCl (**27**, 10 mg, 0,017 mmol) in DMF (0,5 mL) è stato aggiunto Et<sub>3</sub>N (5 μL, 0,036 mmol) e la miscela è stata agitata durante la notte. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta e il

prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-80:20) per produrre BCN-doxorubicina **28a** (6 mg, 0,0062 mmol, 66%). LRMS (ESI+) calcolato per  $C_{49}H_{61}N_3O_{17}$  ( $M+H^+$ ) 964,4, trovato 963,9.

*Esempio 4-2. Sintesi di coniugato BCN-doxorubicina 28b*

5 **[0265]** Ad una soluzione di  $H_2N-PEG_8-COOH$  (822 mg, 1,86 mmol) in THF:H<sub>2</sub>O 1:1 (20 mL) sono stati aggiunti BCN-OSu (**23**) (651 mg, 2,23 mmol) e Et<sub>3</sub>N (774  $\mu$ L, 5,59 mmol). La reazione è stata agitata a t. a. per 1,5 ore e acidificata a pH 1 seguita da estrazione con EtOAc (3 x 35 mL). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrati e il solvente rimosso a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato poi disciolto in DCM  
10 secco (20 mL) e successivamente sono stati aggiunti DCC (461 mg, 2,23 mmol) e NHS (257 mg, 2,23 mmol). Dopo agitazione a t.a. per 1 ora, la reazione è stata filtrata e il filtrato concentrato sotto vuoto. La cromatografia flash (MeCN, MeCN:H<sub>2</sub>O 30:1) ha prodotto BCN-PEG8-COOSu.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5,44 (br s, 1H), 4,14 d, J = 8,1 Hz, 2H), 3,84 (t, J = 6,3  
15 Hz, 2H), 3,68-3,63 (m; 30H), 3,56 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,34 (q, J = 5,4 Hz, 2H), 2,90 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2,85 (s; 4H), 2,36-2,14 (m, 6H). 1,72-1,49 (m; 2H), 1,36 (qn, J = 8,7 Hz, 1H), 1,02-0,88 (m, 2H). LRMS (ESI+) calcolato per  $C_{34}H_{54}N_2O_{14}$  ( $M+Na^+$ ) 737.35, trovato 737,3.

**[0266]** Ad una soluzione di doxorubicina.HCl (27,500 mg, 0,862 mmol) in DMF anidro  
20 (10 mL) è stata aggiunta trietilammina (361  $\mu$ L, 262 mg, 2,59 mmol) e una soluzione di BCN-PEG<sub>8</sub>-COOSu (678 mg, 0,948 mmol) in DMF (10 mL). La miscela risultante è stata agitata per 22 ore e concentrata con 3 g di gel di silice. Dopo la purificazione per mezzo della cromatografia a colonna, il prodotto è stato ottenuto come materiale amorfo rosso (757 mg, 0,66 mmol, 77%). LRMS (HPLC; ESI-) calcolato per  $C_{57}H_{77}N_2O_{22}$  ( $M-H^+$ )  
25 1141,5, trovato 1142,2.

*Esempio 5. Sintesi di DIBAC-biotina 30 (illustrata schematicamente nella figura 8)*

[0267] Ad una soluzione di ammina **29**, disponibile in commercio da ClickChemistryTools (50 mg, 0,18 mmol) in DMF (2 mL) è stato aggiunto biotina-OSu (62 mg, 0,18 mmol) e Et<sub>3</sub>N (50 µL, 0,36 mmol). La miscela di reazione è stata agitata per  
5 3 ore seguita da concentrazione a pressione ridotta.

La cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-90:10) ha prodotto DIBAC-biotina **30** (44 mg, 0,09 mmol, 49%). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,66-7,62 (m; 1H), 7,40-7,24 (m; 7H), 6,67-6,60 (m; 1H), 6,53-6,49 (m, 1H), 5,75 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,13 (dd, J = 2,9,14,0 Hz, 1H), 4,47-4,43 (m, 1H), 4,29-4,28 (m, 1H), 3,68 (d, J = 13,9 Hz, 1H), 3,34-  
10 3,30 (m, 1H), 3,17-3,08 (m, 2H), 2,92-2,67 (m, 3H), 2,50-2,42 (m, 1H), 2,10-1,95 (m, 2H), 1,73-1,24 (m, 6H). LRMS (ESI+) calcolato per C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (M+H<sup>+</sup>) 503,2, trovato 503,1.

*Esempi 6 - 9: sintesi di coniugato BCN-doxorubicina 35*

[0268] Lo schema di reazione per la sintesi di coniugato BCN-doxorubicina **35** a partire  
15 da Fmoc-citrullina **31**, come realizzato negli Esempi 7 - 10, è mostrato in figura 9.

*Esempio 6. Sintesi di derivato di citrullina 32*

[0269] Isobutilcloroformiato (99 µL, 0,76 mmol) e N-metilmorfolina (83 µL, 0,76 mmol) sono stati aggiunti ad una soluzione di Fmoc-citrullina **31** (300 mg, 0,76 mmol) in THF a -40 °C. La soluzione è stata agitata per 2 ore seguita dall'aggiunta di p-aminobenzilalcol  
20 (112 mg, 0,91 mmol) e N-metilmorfolina (100 µL, 0,91 mmol). Dopo 1 ora di agitazione, la soluzione è stata lentamente riscaldata a ta e dopo 2 ore la miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta. La purificazione per mezzo di cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-80:20) ha prodotto un derivato di citrullina **32** (346 mg, 0,69 mmol, 90%). LRMS (ESI+) calcolato per C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (M+H<sup>+</sup>) 503,2, trovato 503,1.

25 *Esempio 7. sintesi di dipeptide 33*

[0270] Il derivato di citrullina **32** (100 mg, 0,20 mmol) è stato disciolto in DMF (1,6 mL) ed è stata aggiunta piperidina (333  $\mu$ L). Dopo 2 ore, la reazione è stata concentrata a pressione ridotta e il prodotto grezzo è stato disciolto in DMF (2 mL). Sono stati aggiunti Alloc Val-OSu (60 mg, 0,20 mmol) e Et<sub>3</sub>N (58  $\mu$ L, 0,40 mmol), la miscela è stata agitata  
5 durante la notte e successivamente concentrata sotto vuoto. La purificazione per mezzo della cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-90:10) ha prodotto dipeptide **33** (65 mg, 0,14 mmol, 70%). LRMS (ESI+) calcolato per C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> (M+H<sup>+</sup>) 464,2, trovato 464,0.

*Esempio 8. sintesi di dipetide-doxorubicina 34*

10 [0271] Ad una soluzione di dipeptide **33** (40 mg, 0,086 mmol) in DMF (0,5 mL) sono stati aggiunti Et<sub>3</sub>N (36  $\mu$ L, 0,26 mmol) e DSC (66 mg, 0,26 mmole). La miscela di reazione è stata agitata durante la notte seguita da concentrazione a pressione ridotta. La purificazione per mezzo della cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-90:10) ha prodotto il prodotto (30 mg, 0,05 mmol, 58%) che è stato immediatamente disciolto in DMF (0,5  
15 mL). Sono stati aggiunti doxorubicina.HCl **27** (29 mg, 0,05 mmol) e Et<sub>3</sub>N (20  $\mu$ L, 0,15 mmol), la miscela di reazione è stata agitata per 2 ore e successivamente concentrata a pressione ridotta. La purificazione per mezzo della cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-80:20) ha prodotto dipeptide-doxorubicina **34** (34 mg, 0,033 mmol, 66%). LRMS (ESI+) calcolato per C<sub>50</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>18</sub> (M+H<sup>+</sup>) 1033,4, trovato 1032,9.

20 *Esempio 9. sintesi di coniugato BCN-doxorubicina 35*

[0272] Dipeptide-doxorubicina **34** (8 mg, 0,008 mmol) è stato disciolto in DMF (0,5 mL) e sono stati aggiunti trifenilsilano (7  $\mu$ L, 0,054 mmol) e Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,6 mg, 0,0005 mmol). Dopo l'agitazione durante la notte, la reazione è stata concentrata a pressione ridotta e sospesa in DCM (2 mL). Dopo la filtrazione il prodotto grezzo è stato ottenuto come solido  
25 rosso che è stato disciolto in DMF (0,5 mL). Sono stati aggiunti il derivato di BCN **26**

(3 mg, 0,006 mmol) e Et<sub>3</sub>N (2 μL, 0,014 mmol) e la reazione è stata agitata durante la notte.

I solventi sono stati rimossi a pressione ridotta e la purificazione per mezzo della cromatografia a colonna flash (DCM:MeOH 99:1-60:40) ha prodotto il coniugato BCN-doxorubicina **35** (3 mg, 0,002 mmol, 27%). LRMS (ESI+) calcolato per C<sub>68</sub>H<sub>88</sub>N<sub>8</sub>O<sub>22</sub> (M+H<sup>+</sup>) 1369,8, trovato 1369,3.

*Esempio 9-2. Sintesi di BCN-vc-PABA-MMAE (37a)*

[0273] Ad una soluzione di Val-Cit-PAB-MMAE.TFA (8,0 mg, 6,5 μmol) e trietilammina (3,5 μL) in DMF anidro (1 mL) è stato aggiunto BCN-PEG<sub>2</sub>-OSu (2,7 mg, 6,5 μmol) (**36**) come soluzione in DMF (0,78 mL). Il prodotto (6 mg, 4 μmol, 62%) è stato ottenuto dopo la purificazione per mezzo di HPLC a fase invertita (C18, gradiente H<sub>2</sub>O/MeCN). LRMS (ESI+) calcolato per C<sub>74</sub>H<sub>115</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>17</sub> (M+Na<sup>+</sup>) 1452,84, trovato 1452,7.

*Esempio 9-3. Sintesi di BCN-vc-PABA-MMAF (37b)*

[0274] Ad una soluzione di Val-Cit-PAB-MMAF.TFA (17,9 mg, 14,3 μmol) in DMF (2 mL) è stato aggiunto BCN-PEG<sub>2</sub>-OSu (17,9 mg, 14,3 μmol) (**36**) come soluzione in DMF (0,78 mL) e trietilammina (6,0 μL). Il prodotto (7 mg, 5 μmol, 35%) è stato ottenuto dopo la purificazione per mezzo di HPLC a fase invertita (C18, gradiente H<sub>2</sub>O/MeCN 1% AcOH). LRMS (HPLC; ESI+) calcolato per C<sub>74</sub>H<sub>114</sub>N<sub>11</sub>O<sub>18</sub> (M+H<sup>+</sup>) 1444,83, trovato 1445,44.

*Esempio 9-4. Sintesi di BCN-MMAF (38)*

[0275] Ad una soluzione di Val-Cit-PABA-MMAF (7,6 mg, 0,0074 mmol) in DMF (0,2 mL) è stato aggiunto estere di BCN-OSu 26 (8 mg, 0,015 mmol) e Et<sub>3</sub>N (3 μL, 2,2 mg, 0,022 mmol). Dopo la reazione durante la notte, la miscela è stata concentrata. La purificazione per mezzo della cromatografia a colonna (MeOH/DCM 1/3) ha prodotto il prodotto desiderato (3,4 mg, 0,0022 mmol, 29%). LRMS (HPLC; ESI+) calcolato per

$C_{80}H_{125}N_{12}O_{19}$  ( $M+H^+$ ) 1557,92, trovato 1558,16.

*Esempio 9-5. Sintesi di BCN-vc-PABA-maitansinoide (39)*

[0276] Ad una sospensione di Val-Cit-PABA-  $\beta$ -alaninoil-maitansinoide (disponibile in commercio da Concortis) (27 mg, 0,022 mmol) in MeCN (2 mL) è stata aggiunta  
5 trietilammina (9,2  $\mu$ L, 6,7 mg, 0,066 mmol) e una soluzione di carbonato BCN-PEG<sub>2</sub> OSu (9,2 mg, 0,022 mmol) in MeCN (1 mL). Dopo 23 ore, la miscela è stata versata in una miscela di EtOAc (20 mL) e acqua (20 mL). Dopo la separazione, la fase organica è stata essiccata ( $Na_2SO_4$ ) e concentrata. Dopo la purificazione per mezzo della cromatografia a colonna (EtOAc  $\rightarrow$  MeOH/EtOAc 1/4) sono stati ottenuti 22 mg (0,015 mmol, 70%) del  
10 prodotto desiderato. LRMS (ESI+) calcolato per  $C_{70}H_{97}CN_{10}O_{20}$  ( $M+H^+$ ) 1432,66, trovato 1434,64.

*Esempio 9-6. Sintesi di maleimmide-vc-PABA-maitansinoide (40)*

[0277] Ad una soluzione di Val-Cit-PABA-  $\beta$ -alaninoil-maitansinoide (13,9 mg, 0,011 mmol) (disponibile in commercio da Concortis, San Diego, USA) in DMF anidro (1 mL)  
15 è stato aggiunto trietilammina (4,5  $\mu$ L, 3,3 mg, 0,033 mmol) e N-succinimidile 6-maleimidocaproato (3,9 mg, 0,013 mmol). Dopo l'agitazione per un tempo appropriato, la miscela è stata suddivisa su EtOAc (20 mL) e  $NaHCO_3$  saturo acquoso (10 mL). Dopo la separazione, lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (20 mL). Gli strati organici combinati sono stati essiccati ( $Na_2SO_4$ ) e concentrati. Dopo la purificazione per mezzo di  
20 HPLC a fase invertita (C18, gradiente  $H_2O/MeCN$ ), sono stati ottenuti 10 mg (0,0077 mmol) del prodotto desiderato. LRMS (HPLC, ESI+) calcolato per  $C_{64}H_{88}ClN_{10}O_{18}$  ( $M+H^+$ ) 1390,60, trovato 1390,52.

[0278] Gli esempi soprastanti 9-3 a 9-6 sono illustrati schematicamente nello schema 10a.

*Esempio 9-7. Sintesi di DIBAC-vc-PABA-MMAF 41 (illustrata schematicamente nello  
25 schema 11)*

[0279] DIBAC-ammina **29**, disponibile in commercio da ClickChemistryTools (430 mg, 1,50 mmol) è stata disciolta in DCM (15 mL) e trattata con anidride di acido glutarico (213 mg, 1,87 mmol) e Et<sub>3</sub>N (647 µL, 4,67 mmol) a t.a. La reazione è stata agitata per 2 ore, seguita dall'aggiunta di DSC (478 mg, 1,87 mmol). Dopo altre 2 ore di agitazione a  
5 ta, è stato aggiunto DCM (30 mL) e la reazione è stata lavata con H<sub>2</sub>O (3 x 20 mL). La fase organica è stata essiccata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente rimosso a pressione ridotta. La cromatografia flash (0:100-2:98 EtOAc:MeOH) ha prodotto l'estere di DIBAC-OSu (368 mg, 0,75 mmol, 48%).

[0280] Poi, ad una soluzione dell'estere di DIBAC-OSu (1 mg, 0,003 mmol) in DMF (0.2  
10 mL) è stato aggiunto vc-PABA-MMAF (2 mg, 0,002 mmol) e trietilammina (1 µL, 0,007 mmol). La soluzione è stata agitata durante la notte seguita da concentrazione. La purificazione con HPLC (a fase invertita, MeCN:H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA) ha fornito **41** (0,9 mg, 0,0006 mmol, 33%). L'analisi LCMS ha fornito un picco con la massa 1510,40 (prevista per C<sub>81</sub>H<sub>113</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub> = 1510,83).

15 *Esempi 9-8 - 9-11. Protocollo generale per sintesi di altri doxorubicina-cicloottini*

[0281] Ad una soluzione di 0,1 M del cicloottino attivato (1-2 equiv) in DCM/DMF (1:1) è stata aggiunta Doxorubicina.HCl (27,1 equiv) e trietilammina (1,5 equiv). La soluzione rossa è stata agitata durante la notte seguita da concentrazione sotto vuoto. La miscela grezza è stata preimpaccata su silice usando DMF come solvente seguito da cromatografia  
20 a colonna (DCM → DCM:MeOH 8:2) per produrre il prodotto desiderato.

*Esempio 9-9. Sintesi di doxorubicina-MFCO 42.*

[0282] L'estere di MFCO-OSu (disponibile in commercio da Berry and Associates, Dexter, Michigan, USA) (3,4 mg, 0,009 mmol) è stato fatto reagire con Doxorubicina.HCl (27, 5 mg, 0,009 mmol) secondo il procedimento generale per produrre doxorubicina-  
25 MCFO **42** (5 mg, 0,006 mmol, 69%). L'analisi LCMS ha fornito un picco con la massa

831,88 (prevista per  $C_{42}H_{49}FN_2NaO_{13} = 831,31$ ).

*Esempio 9-10. Sintesi di doxorubicina-cicloottino 43.*

[0283] Cicloott-4-in-1-olo (Chem. Ber. 1986, 119,297-312.) è stato convertito nel suo derivato di carbonato di p-nitrofenile (5 mg, 0,017 mmol), che è stato fatto reagire con  
5 Doxorubicina.HCl (27,5 mg, 0,009 mmol) secondo il procedimento generale per produrre doxorubicina-cicloottino 43 (6 mg, 0,008 mmol, 94%).

*Esempio 9-11. Sintesi di doxorubicina-DIBO 44*

[0284] Secondo il procedimento generale, il carbonato DIBO OSu (disponibile in commercio da LifeTechnologies, 5 mg, 0,013 mmol) è stato fatto reagire con doxorubicina  
10 (27, 5 mg, 0,009 mmol) per permettere DIBO-doxorubicina 44 (7 mg, 0,008 mmol, 90%).

[0285] Gli esempi soprastanti 9-8 a 9-11 sono illustrati schematicamente nello schema 12.

*Esempio 9-12. Sintesi di alchilino-biotina 45*

[0286] Ad una soluzione di biotina-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> in diclorometano (6 mL) è stato aggiunto trietilammina (54 µL, 39 mg, 0,39 mmole) ed estere di succinimidile di acido pent-4-  
15 inoico (25 mg, 0,13 mmol). Dopo 19 ore, la miscela di reazione è stata concentrata e il residuo è stato purificato per mezzo della cromatografia a colonna (5→ 20 % MeOH in DCM). Il prodotto purificato è stato disciolto in DCM filtrato e concentrato, il che ha prodotto il prodotto desiderato come solido bianco (52 mg, 0,11 mmole, 85%).

*Esempio 9-13. Sintesi di O-alchil idrossilammina biotina 47*

20 [0287] Ad una soluzione di dietilene-glicole (0,89 mL, 1g, 9,42 mmol) in 80 mL di THF secco è stato aggiunto PPh<sub>3</sub> (5,43 g, 20,7 mmol) e N-idrossiftalimmide. Dopo raffreddamento a 0°C, è stata aggiunta una soluzione DEAD al 40 % in toluene (9,44 mL, 20,7 mmol). La miscela è stata mescolata per 21 ore. Il prodotto è stato filtrato via e lavato con EtOAc. Il prodotto è stato ottenuto come solido bianco (1,73 g, 4,37 g). <sup>1</sup>H NMR (300  
25 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,85 - 7,66 (m, 8H), 4,31 - 4,20 (m, 4H), 3,92 - 3,78 (m, 4H).

Poi, 1,5 g (3,78 mmol) del prodotto ottenuto nella fase precedente è stato disciolto in 7 N NH<sub>3</sub> in MeOH, riscaldato a 40 °C e agitato per 20 ore. E' stato poi raffreddato a t.a. mentre l'argon è stato trasformato in bolle attraverso la miscela di reazione. La miscela di reazione è stata concentrata e il residuo è stato disciolto in DCM (50 mL), filtrato e concentrato. Il residuo è stato purificato per mezzo della cromatografia a colonna (2→ 5% MeOH in DCM). Resa: 0,46 g (3,38 mmol, 89%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,51 (s, 4H), 3,88-3,82 (m, 4H), 3,71-3,64 (m, 4H).

[0288] Gli esempi soprastanti 9-12 e 9-13 sono schematicamente illustrati nello schema 13.

10 *Esempi 9-14 - 9.17: sintesi di derivati UDP-GalNAc 52-55*

[0289] Lo schema di reazione della sintesi di derivati UDP-GalNAc **52-54**, a partire da **51**, è mostrato in figura 14. I composti **55** e **56** sono stati acquistati da Glycohub, Inc. (USA).

*Esempio 9-14. Sintesi di UDP-GalNH<sub>2</sub> 51*

15 [0290] Il composto **48** è stato preparato da D-galattosamina secondo il procedimento descritto per D-glucosammina in Linhardt et al., J. Org. Chem. 2012, 77,1449-1456. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 5,69 (dd, J = 6,84, 6,84 Hz, 1H), 5,43-5,41 (m, 1H), 5,35 (dd, J = 10,9, 3,4 Hz, 1H), 4,54 (t, J = 6,48 Hz, 1H), 4,23-4,12 (m, 1H), 4,04 (dd, J = 10,9,6,1 Hz, 1H), 3,82 (dt, J = 11,1,2,7 Hz, 1H), 2,12 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,99 (s, 3H).  
20 LRMS (ESI-) calcolato per C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub> (M-H<sup>+</sup>) 410,06, trovato 410,1.

[0291] Successivamente, il composto **48** è stato accoppiato a UMP in conformità a Baisch et al. Bioorg. Med. Chem., 1997, 5, 383-391).

[0292] Così, una soluzione di sale bisodico D-uridina-5'-monofosfato (1,49 g, 4,05 mmol) in H<sub>2</sub>O (15 mL) è stata trattata con DOWEX 50Wx8 (forma H<sup>+</sup>) per 30 minuti e filtrata.  
25 Il filtrato è stato agitato vigorosamente a t.a. mentre la tributillamina (0,966 mL, 4,05

mmol) è stata aggiunta goccia a goccia. Dopo 30 minuti di ulteriore agitazione, la miscela di reazione è stata liofilizzata e ulteriormente essiccata su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sottovuoto per 5 ore.

[0293] Il risultante uridina-5'-monofosfato di tributilammonio è stato disciolto in DMF secco (25 mL) in un'atmosfera di argon. Il carbonildiimidazolo (1,38 g, 8,51 mmol) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a t.a. per 30 min. Successivamente, è stato aggiunto MeOH secco (180 µL) e agitato per 15 min per rimuovere CDI in eccesso. Il rimasuglio di MeOH è stato rimosso sotto alto vuoto per 15 min. Successivamente, il composto **48** (2,0 g, 4,86 mmol) è stato disciolto in DMF secco (25 mL) e aggiunto goccia a goccia alla miscela di reazione. La reazione è stata lasciata agitare a t.a. per 2 giorni prima della concentrazione sotto vuoto. Il consumo del composto intermedio UMP-imidazolo è stato monitorato mediante MS. La cromatografia flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) ha prodotto il prodotto **49** (1,08 g, 1,51 mmol, 37%).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7,96 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,98-5,94 (m, 2H), 5,81-5,79 (m, 1H), 5,70 (dd, J = 7,1,3,3 Hz, 1H), 5,49 (dd, J = 15,2,2,6 Hz, 1H), 5,30 (ddd, J = 18,5, 11,0,3,2 Hz, 2H), 4,57 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 4,35-4,16 (m, 9H), 4,07-3,95 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,08 (s; 3H), 2,07 (s, 3H). LRMS (ESI-) calcolato per C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub> (M-H<sup>+</sup>) 716,09, trovato 716,3.

[0294] Il composto **49** è stato deacetilato in conformità a Kiso et al., Glycoconj. J., 2006, 23,565-573).

[0295] Così, il composto **49** (222 mg, 0,309 mmol) è stato disciolto in H<sub>2</sub>O (2,5 mL) e sono stati aggiunti trietilammina (2,5 mL) e MeOH (6 mL). La miscela di reazione è stata agitata per 3 ore e poi concentrata sotto vuoto per produrre UDP-2-aoturo-2-deossi-D-galattosio grezzo (**50**). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7,99 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 6,02-5,98 (m, 2H), 5,73 (dd, J = 7,4,3,4 Hz, 1H), 4,42-4,37 (m, 2H), 4,30-4,18 (m, 4H), 4,14-4,04 (m, 2H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,65-3,58 (m, 1H). LRMS (ESI-) calcolato per C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub>

(M-H<sup>+</sup>) 590,05, trovato 590,2.

[0296] Infine, ad una soluzione di composto 50 in H<sub>2</sub>O:MeOH 1:1 (4 mL) è stato aggiunto il catalizzatore di Lindlar (50 mg). La reazione è stata agitata sotto un'atmosfera di idrogeno per 5 ore e filtrata su celite. Il filtro è stato risciacquato con H<sub>2</sub>O (10 ml) e il  
 5 filtrato è stato concentrato sotto vuoto per produrre l'UDP-D-galattosamina (UDP-GalNH<sub>2</sub>, 51) (169 mg, 0,286 mmol, 92% di resa su due fasi). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7,93 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,99-5,90 (m, 2H), 5,76-5,69 (m, 1H), 4,39-4,34 (m, 2H), 4,31-4,17 (m, 5H), 4,05-4,01 (m, 1H), 3,94-3,86 (m, 1H), 3,82-3,70 (m, 3H), 3,30-3,16 (m, 1H). LRMS (ESI-) calcolato per C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>16</sub>P<sub>2</sub> (M-H<sup>+</sup>) 564,06, trovato 564,1.

10 *Esempio 9-15. Sintesi di UDP-GalNAz 52*

[0297] L'estere di succinimidile di acido azoturoacetico è stato preparato secondo il procedimento in Hamilton et al, Chem. Eur. J., 2012, 18,2361-2365.

[0298] UDP-D-galattosammina (**51**) (82 mg, 0,145 mmol) è stata disciolta in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) e sono stati aggiunti estere di succinimidile di acido azoturoacetico (86  
 15 mg, 0,435 mmol) e DMF (2 mL). La reazione è stata agitata durante la notte a t.a. e successivamente concentrata sotto vuoto. La cromatografia flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) ha prodotto UDP-GalNAz (**52**) (34 mg, 0,052 mmol, 36%).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8,73 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,90-5,82 (m, 2H), 5,49 (dd, J = 6,9,3,3 Hz, 1H), 4,29-4,05 (m, 7H), 4,03-3,85 (m, 4H), 3,72-3,61 (m, 2H). LRMS (ESI-)  
 20 calcolato per C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>17</sub>P<sub>2</sub> (M-H<sup>+</sup>) 647,08, trovato 647,1.

*Esempio 9-16. Sintesi di UDP-galnac-ina 53*

[0299] L'estere di succinimidile di acido pent-4-inoico è stato preparato secondo il procedimento in Rademann et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51,9441-9447.

[0300] UDP-D-galattosammina (**51**) (53 mg, 0,094 mmol) è stata disciolta in 0,1 M  
 25 NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) e sono stati aggiunti estere di succinimidile di acido pent-4-inoico

(37 mg, 0,188 mmol) e DMF (2 mL). La reazione è stata agitata durante la notte a t.a. e concentrata sotto vuoto. La cromatografia flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) ha prodotto UDP-galnac-ino (**53**) (42 mg, 0,065 mmol, 69%).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7,78 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,84-5,76 (m, 2H), 5,39 (dd, J = 6,8, 3,2 Hz, 1H), 4,22-4,16 (m, 2H), 4,14-3,97 (m, 5H), 3,88-3,85 (m, 1H), 3,81-3,75 (m, 1H), 3,63-3,55 (m, 2H), 2,45-2,28 (m, 5H), 2,19 (t, J = 2,4 Hz, 1H). LRMS (ESI-) calcolato per C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>17</sub>P<sub>2</sub> (M-H<sup>+</sup>) 644,09, trovato 644,1.

*Esempio 9-17. Sintesi di UDP-GalNLev **54***

**[0301]** L'estere di succinimidile di acido levulinico è stato preparato secondo il procedimento per estere di succinimidile di acido pent-4-inoico in Rademann et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51,9441-9447.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,81 (s, 4H), 2,77 (s, 4H), 2,14 (s, 3H).

**[0302]** UDP-D-galattosammina (**51**) (53 mg, 0,094 mmol) è stata disciolta in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) e sono stati aggiunti estere di succinimidile di acido levulinico (40 mg, 0,188 mmol) e DMF (2 mL). La reazione è stata agitata durante la notte a t.a. e il solvente è stato rimosso a pressione ridotta. La cromatografia flash (7:2:1-5:2:1 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O) ha prodotto UDP-GalNLev (**54**) (10 mg, 0,015 mmol, 16%).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7,78 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,82-5,77 (m, 2H), 5,36 (dd, J = 6,8, 3,2 Hz, 1H), 4,22-4,15 (m, 2H), 4,13-3,95 (m, 5H), 3,88-3,84 (m, 1H), 3,82-3,75 (m, 1H), 3,64-3,52 (m, 3H), 2,74-2,61 (m, 2H), 2,47-2,37 (m, 2H), 2,05 (s, 3H). LRMS (ESI-) calcolato per C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub> (M-H<sup>+</sup>) 662,10, trovato 662,1.

*Esempio 9-18. Sintesi di BCN-MMAF (**56**)*

**[0303]** Ad una soluzione di MMAF.TFA (8,1 mg, 0,0096 mmol) in DMF (0,3 mL) è stato aggiunto Et<sub>3</sub>N (5 μL, 3,6 mg, 0,036 mmol) e BCN-PEG<sub>2</sub>-OSu (**36**) (19 mg, 0,045 mmol). Dopo la reazione durante la notte, la miscela è stata concentrata. La purificazione per

mezzo della cromatografia a colonna (DCM → MeOH/DCM 1/3) ha prodotto il prodotto desiderato. LRMS (HPLC; ESI+) calcolato per  $C_{55}H_{87}N_6O_{13}$  ( $M+H^+$ ) 1039,63, trovato 1039,72.

### ***Protocollo generale per la modificazione di IgG***

#### 5 *Rimozione di glicani di IgG con endo S*

[0304] La rimozione di glicani di IgG è stata effettuata usando endo S da *Streptococcus pyogenes* (disponibile in commercio da Genovis, Lund, Svezia). IgG (10 mg/mL) è stato incubato con endo S (40 U/mL) in 25 mM Tris a pH 8.0 per approssimativamente 16 ore a 37 °C. IgG deglicosilato è stato concentrato e lavato con 10 mM  $MnCl_2$  e 25 mM Tris-HCl a pH 8.0 usando una membrana Amicon Ultra-0.5; Ultracel-10 (Millipore).

#### *Analisi degli spettri di massa*

[0305] Una soluzione di 50 µg di IgG (modificato), 1 M Tris-HCl a pH 8.0, 1 mM di EDTA e 30 mM di DTT con un volume totale di approssimativamente 70 µL è stata incubata per 20 minuti a 37 °C per ridurre i ponti di disolfuro permettendo di analizzare sia la catena leggera che pesante. Se presenti, le funzionalità di azoturo sono ridotte alle ammine in queste condizioni. I campioni ridotti sono stati lavati tre volte con milliQ usando una membrana Amicon Ultra-0.5; Ultracel-10 (Millipore) e concentrati a 10 µM di IgG (modificato). IgG ridotto è stato analizzato mediante ionizzazione di elettrospray a tempo di volo (ESI-TOF) su un JEOL AccuTOF. Gli spettri deconvoluti sono stati ottenuti usando il software Magtran.

#### *Esempio 10. Rimozione di trastuzumab (Figura 15a + 15b)*

[0306] Il trastuzumab è stato assoggettato al protocollo di rimozione soprastante. Dopo deconvoluzione dei picchi, lo spettro di massa ha mostrato un picco della catena leggera e due picchi della catena pesante. I due picchi della catena pesante appartenevano ad un prodotto maggiore (49496 Da, 90 % della catena pesante totale), risultante da trastuzumab

sostituito con GlNAc(Fuc) del nucleo, e un prodotto minore (49351 Da,  $\pm 10\%$  della catena pesante totale), risultante da trastuzumab sostituito da GlcNac del nucleo.

*Esempio 11. Rimozione di bevacizumab*

5 [0307] Il trattamento di bevacizumab simile al trastuzumab ha portato alla formazione di un prodotto della catena pesante maggiore (50062 Da,  $\pm 90\%$ ) insieme con alcuni prodotti della catena pesante minore ( $\pm 10\%$ ).

*Esempio 12. Rimozione di cetuximab*

10 [0308] Il cetuximab differisce da trastuzumab per il fatto che esso contiene un secondo sito di N-glicosilazione a N88. Il glicano a N88 è situato nella regione Fab e ha una costituzione differente dal glicano a N297. Il trattamento di cetuximab simile al trastuzumab ha portato alla formazione di una serie di prodotti a catena pesante con masse di 51600 Da-52300 Da (picchi maggiori a 51663 Da e 51808 Da), indicando che soltanto un glicano è stato rimosso mediante Endo S, presumibilmente a N297.

*Esempio 12-1. Rimozione di rituximab*

15 [0309] Il trattamento di rituximab simile al trastuzumab ha portato alla formazione di un prodotto della catena pesante maggiore (49408 Da).

*Esempio 12-2. Rimozione tentata di trastuzumab con endo H*

20 [0310] Il trastuzumab è stato incubato con endoglicosidasi H (EndoH) da *Streptomyces picatus* (disponibile in commercio da New England BioLabs). Concentrazioni crescenti di endo H ( $\leq 115$  U/ $\mu$ L) sono state aggiunte a trastuzumab (10 mg/mL) in 50 mM di citrato di sodio a pH 5.5 e incubate a 16 ore a 37 °C. Gli spettri di massa hanno mostrato soltanto picchi corrispondenti alla catena pesante glicosilata nativa (50589 e 50752 Da corrispondente alle isoforme G0F e G1F, rispettivamente), indicando che trastuzumab non può essere rimosso usando endo H.

25 *Esempio 12-3. Rimozione tentata di trastuzumab con endo M*

[0311] Trastuzumab (10 mg/mL) è stato incubato con concentrazioni crescenti di endo-  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasi (endo M,  $\leq 231$  mU/mL) da *Mucor hiemalis* (disponibile in commercio da TCI Europe N.V.) in 50 mM di citrato di sodio a pH 6.0 e incubato per 16 ore a 37 °C. Lo spettro di massa ha mostrato picchi maggiori corrispondenti alla catena pesante glicosilata nativa (50589 e 50752 Da corrispondente alle isoforme G0F e G1F, rispettivamente). In aggiunta, è stato osservato un prodotto minore (49347 Da,  $\pm 5\%$  della catena pesante totale), risultante dalla catena pesante sostituita di GlcNac del nucleo. Questi risultati mostrano che soltanto glicoforme di trastuzumab carenti del fucosio del nucleo possono essere rimosse mediante endo M.

5  
10 *Glicosiltrasferimento di un derivato di galattosio (per es. azoturo zucchero) con Gal-T1(Y289L)*

[0312] L'introduzione enzimatica di derivato di galattosio (per es. zucchero contenente azoturo) su IgG è stata effettuata con un mutante di  $\beta(1,4)$ -galattosiltransferasi bovina [ $\beta(1,4)$ -Gal-T1(Y289L)]. IgG deglicosilato (preparato come descritto in precedenza, 10 mg/mL) è stato incubato con un derivato di UDP-galattosio modificato (per es. un derivato di zucchero-UDP modificato da azoturo) (0,4 mM) e  $\beta(1,4)$ -Gal-T1(Y289L) (1 mg/mL) in 10 mM di  $MnCl_2$  e 25 mM Tris-HCl a pH 8.0 per 16 ore a 30 °C.

[0313] Il IgG funzionalizzato (per es. IgG funzionalizzato con azoturo) è stato incubato con agarosio proteina A (40  $\mu$ L per mg di IgG) per 2 ore a 4 °C. L'agarosio proteina A è stato lavato tre volte con soluzione salina al fosfato (PBS) e l'IgG è stato eluito con 100 mM di glicina-HCl a pH 2.7. IgG eluito è stato neutralizzato con 1 M Tris-HCl pH 8.0 e concentrato e lavato con PBS usando una membrana Amicon Ultra-0.5; Ultracel-10 (Millipore) ad una concentrazione di 15-20 mg/mL.

*Esempio 13. Trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (Figura 15c)*

25 [0314] Trastuzumab è stato assoggettato al protocollo Glicosiltransfer con

UDP-N-azoturoacetilgalattosammina 52 (UDP-GalNAz). Dopo la purificazione per affinità della proteina A, l'analisi degli spettri di massa ha indicato la formazione di un prodotto maggiore di (49713 Da, 90% della catena pesante totale), risultante dal trasferimento di GalNAz a trastuzumab sostituito con GlcNAc(Fuc) del nucleo, e un  
5 prodotto minore (49566 Da,  $\pm 10\%$  della catena pesante totale), risultante dal trasferimento di GalNAz a trastuzumab sostituito da GlcNAc del nucleo.

*Esempio 14. Bevacizumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0315] Bevacizumab (7,5 mg, 10mg/mL) è stato rimosso con Endo S secondo il protocollo generale. Il bevacizumab rimosso (10 mg/mL) è stato incubato con UDP-GalNAz 52 (65  
10  $\mu$ L, 10 mM) e  $\beta(1,4)$ -GalT1(Y289L) (75  $\mu$ L, 2 mg/mL) in 10 mM di MnCl<sub>2</sub> e 25 mM Tris-HCl pH 8.0 per 16 ore a 30 °C. La purificazione con ProtA ha prodotto il bevacizumab modificato (3,2 mg). L'analisi AccuTOF ha mostrato la formazione di un prodotto della catena pesante maggiore (50282 Da,  $\pm 95\%$ ).

*Esempio 15. Cetuximab(GalNAz)<sub>2</sub>*

15 [0316] Il cetuximab (7,5 mg, 10mg/mL) è stato rimosso con endo S secondo il protocollo generale. Il cetuximab rimosso (10 mg/mL) è stato incubato con UDP-GalNAz 52 (65  $\mu$ L, 10 mM) e  $\beta(1,4)$ -GalT1(Y289L) (75  $\mu$ L, 2 mg/mL) in 10 mM di MnCl<sub>2</sub> e 25 mM Tris-HCl a pH 8.0 per 16 ore a 30 °C. La purificazione con ProtA ha fornito il cetuximab modificato (3,2 mg). L'analisi AccuTOF ha mostrato la formazione di due prodotti della  
20 catena pesante maggiore (51884 Da e 52029 Da), in conformità alla rimozione del glicano N297, ma non il glicano Fab.

*Esempio 15-1. Rituximab(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0317] Il rituximab (7,5 mg, 10 mg/mL) è stato rimosso con Endo S secondo il protocollo generale. Il rituximab rimosso (10 mg/mL) è stato incubato con UDP-GalNAz 52 (65  $\mu$ L,  
25 10 mM) e  $\beta(1,4)$ -GalT1(Y289L) (75  $\mu$ L, 2 mg/mL) in 10 mM di MnCl<sub>2</sub> e 25 mM

Tris-HCl a pH 8.0 per 16 ore a 30 °C. La purificazione con ProtA ha fornito il rituximab modificato (3,2 mg). L'analisi AccuTOF ha mostrato una conversione completa al prodotto desiderato (massa 49625, massa prevista 49627).

*Esempio 15-2. Girentuximab(GalNAz)<sub>2</sub>*

5 **[0318]** Il girentuximab è stato rimosso usando endo S secondo il protocollo generale sopradescritto, portando alla formazione di un prodotto della catena pesante maggiore (49427 Da). Il girentuximab rimosso è stato successivamente incubato con UDP-GalNAz e  $\beta(1,4)$ -Gal-T1(Y289L) come descritto in precedenza, che ha condotto alla formazione di un prodotto della catena pesante maggiore (49643 Da).

10 *Esempio 15-3. Trastuzumab(GalNAc-ina)<sub>2</sub>*

**[0319]** Il trastuzumab rimosso (100  $\mu$ L, 10 mg/mL, 6,6 nmol), ottenuto mediante trattamento con endo S di trastuzumab secondo il protocollo generale, è stato incubato con UDP-galnac-ina (**53**) (5  $\mu$ L, 10 mM) e  $\beta(1,4)$ -Gal-T1(Y289L) (5  $\mu$ L, 2 mg/mL) in 10 mM di MnCl<sub>2</sub> e 25 mM Tris-HCl a pH 8.0 per 16 ore a 30 °C. La miscela grezza è stata  
15 purificata con ProtA per produrre trast-(GalNAc-yne)<sub>2</sub> (0,43 mg). L'analisi AccuTOF ha mostrato il 90 % di conversione al prodotto desiderato (massa 49735, massa prevista 49736), è stato osservato il 10 % di sottoprodotto (massa 50379).

*Esempio 15-4. Trastuzumab(GalNLev)<sub>2</sub>*

**[0320]** Il trastuzumab rimosso (100  $\mu$ L, 10 mg/mL, 6,6 nmol), ottenuto mediante  
20 trattamento con endo S di trastuzumab secondo il protocollo generale, è stato incubato con UDP-GalNLev (**54**) (10  $\mu$ L, 10 mM) e  $\beta(1,4)$ -Gal-T1(Y289L) (7,5  $\mu$ L, 2 mg/mL) in 10 mM di MnCl<sub>2</sub> e 25 mM Tris-HCl a pH 8.0 per 16 ore a 30 °C. La miscela grezza è stata purificata con ProtA per fornire trast-(GalNLev)<sub>2</sub> (0,53 mg). L'analisi AccuTOF ha  
25 mostrato 95 % di conversione al prodotto desiderato (massa 49753, massa prevista 49754), è stato osservato 5 % di sottoprodotto (massa 50417).

**Rimozione del trasferimento di + GalNAz a IgG del plasma combinato in pool***Esempio 15-5. Analisi della spettrometria di massa di IgG del plasma*

[0321] Alla miscela di reazione contenente 0,5 mg di IgG del plasma combinato in pool (Lee Biosolutions, Inc) è stata aggiunta la soluzione salina al fosfato (PBS) (220  $\mu$ L) e il  
5 tampone di digestione (250  $\mu$ L, 0,1 mg/mL di papaina, 0,02 M di cisteina, 0,02 M di EDTA nella soluzione salina al fosfato (PBS)) seguita da incubazione per 1 ora a 37 °C. L'impasto di proteina A successivo (100  $\mu$ L) è stato aggiunto e la miscela è stata ruotata da estremità a estremità per 1 ora. La proteina A è stata lavata con soluzione salina al fosfato (PBS) (3  $\times$  1 mL) seguita da eluizione con tampone di glicina.HCl (pH 2.7, 0,1 M,  
10 300  $\mu$ L). La soluzione tampone è stata neutralizzata con Tris-HCl (pH 8.0 ,1 M, 80  $\mu$ L) e successivamente è stato prelevato un campione per l'analisi di massa secondo il protocollo standard (figura 14a).

*Esempio 15-6. Rimozione di IgG del plasma combinato in pool*

[0322] IgG del plasma combinato in pool (170  $\mu$ L, 14 mg/mL) è stato rimosso con endo  
15 S (16  $\mu$ L, 20 U/ $\mu$ L) in 98  $\mu$ L Tris-HCl (25 mM, pH 8.0) per 16 ore a 37 °C. L'analisi è stata effettuata secondo il protocollo di analisi. Le misurazioni AccuTOF hanno mostrato una conversione completa.

[0323] Gli esempi soprastanti 15-5 e 15-6 sono illustrati schematicamente nello schema  
16.

*Esempio 15-7. Trasferimento di GalNAz a IgG del plasma*

[0324] IgG del plasma rimosso (46  $\mu$ L, 10,8 mg/mL, 3,3 nmol) è stato incubato con UDP-  
GalNAz 52 (3,3  $\mu$ L, 10 mM) e  $\beta$ 1,4-Gal-T1(Y289L) (2,5  $\mu$ L, 2 mg/mL) in 10 mM di  
MnCl<sub>2</sub> e 25 mM Tris-HCl a pH 8.0 per 16 ore a 30 °C. L'analisi è stata effettuata in  
25 conformità con il protocollo di analisi di IgG del plasma e le misurazioni AccuTOF hanno mostrato una conversione completa.



*Coniugazione di IgG modificato da azoturo mediante cicloadizione con una sonda di cicloottino*

[0325] Una molecola funzionalizzata con BCN o DIBAC legata covalentemente (in DMSO) è stata diluita nella soluzione salina al fosfato (PBS). IgG purificato contenente  
5 azoturi (100  $\mu$ L di 10 mg/mL) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata ruotata da estremità a estremità per un periodo da 12 a 72 ore a 4 °C. Il coniugato di IgG risultante è stato concentrato e lavato con soluzione salina al fosfato (PBS) usando una membrana Amicon Ultra-0.5; Ultracel-10 (Millipore) ad una concentrazione finale di 10 mg/mL.

*Reazioni di coniugazione di IgG modificato da azoturo mediante cicloadizione promossa  
10 da un ceppo con una sonda di cicloottino*

[0326] Dopo la purificazione della proteina A, IgG contenente azoturo (100  $\mu$ M o 15 mg/mL) è stato aggiunto a 0,01 volume di una soluzione madre di 40 mM di una molecola funzionalizzata con cicloottino legata covalentemente (4 equivalenti) in DMSO o DMF, ruotata da estremità a estremità e mescolata immediatamente per un periodo da 12 a 24  
15 ore, a temperatura ambiente. Se richiesto, questo procedimento è stato ripetuto per ottenere una conversione completa.

[0327] Il coniugato di IgG risultante è stato concentrato e lavato con soluzione salina al fosfato (PBS) usando una membrana Amicon Ultra-0.5; Ultracel-10 (Millipore) ad una concentrazione finale di 10 mg/mL.

20 [0328] Nel caso di ADC, questa fase è stata sostituita dalla purificazione per mezzo della cromatografia ad esclusione di dimensione su una colonna Superdex200.

*Esempio 16. Coniugazione di BCN-biotina a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0329] Il coniugato BCN-biotina @ (2  $\mu$ L 100 mM in DMSO) è stato diluito nella soluzione salina al fosfato (PBS) (98  $\mu$ L) e 5  $\mu$ L di questa soluzione sono stati sottoposti  
25 a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (5  $\mu$ L 10 mg/ml nella soluzione salina al fosfato (PBS).

Il lavaggio e la concentrazione, seguiti dall'analisi degli spettri di massa hanno indicato la presenza di un prodotto maggiore (50294 Da, 90% della catena pesante totale) e un prodotto minore (50148 Da,  $\pm 10\%$  della catena pesante totale).

*Esempio 17. Coniugazione di DIBAC-biotina a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

5 [0330] Il coniugato DIBAC-biotina **30** (2  $\mu\text{L}$  100 mM in DMSO) è stato diluito nella soluzione salina al fosfato (PBS) (98  $\mu\text{L}$ ) e 5  $\mu\text{L}$  di questa soluzione sono stati sottoposti a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (5  $\mu\text{L}$  10 mg/ml nella soluzione salina al fosfato (PBS). Il lavaggio e la concentrazione, seguiti dall'analisi degli spettri di massa hanno indicato la presenza di un prodotto maggiore (50247 Da, 90% della catena pesante totale) e un  
10 prodotto minore (50101 Da,  $\pm 10\%$  della catena pesante totale).

*Esempio 17-1. Coniugazione di DIBAC-vc-PABA-MMAF **41** a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0331] Dopo 1 giorno in conformità all'analisi AccuTOF conversione completa. Massa osservata 51248, massa prevista 51248.

*Esempio 18. Coniugazione di BCN-doxorubicina **28a** a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

15 [0332] BCN-doxorubicina **28a** (4  $\mu\text{L}$  di 50 mM soluzione in DMSO) è stata diluita nella soluzione salina al fosfato (PBS) (896  $\mu\text{L}$ ) e sottoposta a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> come descritto nel procedimento generale. Il lavaggio e la concentrazione, seguiti dall'analisi degli spettri di massa hanno indicato la presenza di un prodotto maggiore (50708 Da, 90% della catena pesante totale) e un prodotto minore (50294 Da,  $\pm 10\%$  della catena pesante  
20 totale).

*Esempio 19. Coniugazione di BCN-doxorubicina **35** a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0333] BCN-doxorubicina **35** (4  $\mu\text{L}$  50 mM in DMSO) è stata diluita nella soluzione salina al fosfato (PBS) (896  $\mu\text{L}$ ) e sottoposta a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> come descritto nel procedimento generale. Il lavaggio e la concentrazione, seguiti dall'analisi degli spettri di  
25 massa hanno indicato la presenza del coniugato di trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> e

BCN-doxorubicina **35** (51114 Da).

*Esempio 20. Coniugazione di BCN-PEG<sub>8</sub>-doxorubicina **28b** a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

**[0334]** L'incubazione di BCN-PEG<sub>8</sub>-doxorubicina (400 μM, 4 eq) con trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (100 μM) nella soluzione salina al fosfato (PBS) ha portato ad una  
5 conversione completa in trastuzumab(PEG<sub>8</sub>-doxorubicina)<sub>2</sub> (prodotti della catena pesante fra 50467 e 51134 Da picco maggiore di 50881 Da corrispondente alla catena pesante con GalNAzGlcNac(Fuc) del nucleo coniugato a BCN-PEG<sub>8</sub>-doxorubicina).

*Esempio 21. Coniugazione di BCN-vc-PABA-doxorubicina **33** a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

**[0335]** BCN-doxorubicina **33** (4 μL di 50 mM soluzione in DMSO) è stata diluita nella  
10 soluzione salina al fosfato (PBS) (896 μL) e sottoposta a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> come descritto nel procedimento generale. Il lavaggio e la concentrazione, seguiti dall'analisi degli spettri di massa hanno indicato la presenza del coniugato di trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> e BCN-vc-PABA-doxorubicina **33** (51114 Da).

*Esempio 22. Coniugazione di BCN-vc-PABA-MMAE **37a** a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

**[0336]** L'incubazione di BCN-vc-PABA-MMAE **37a** (125 μM, 5 eq) con trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (25 μM) nella soluzione salina al fosfato (PBS) per 16 ore ha  
15 protato ad una conversione completa in trastuzumab(vc-PABA-MMAE)<sub>2</sub> (prodotti a catena pesante fra 51137 e 51600 Da picco maggiore di 51283 Da corrispondente alla catena pesante con GalNAzGlcNac(Fuc) del nucleo coniugato a BCN-vc-MMAE, ±95%  
20 della catena pesante totale, e un picco minore a 50520 Da a causa della frammentazione del linker PABA durante la spettrometria di massa, ±5% della catena pesante totale).

*Esempio 23. Coniugazione di BCN-vc-PABA-MMAF **37b** a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

**[0337]** L'incubazione di BCN-vc-PABA-MMAF **37b** (600 μM, 4 + 2 eq) con trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (100 μM) nella soluzione salina al fosfato (PBS) per  
25 approssimativamente 16 ore ha portato ad una conversione completa in

trastuzumab(vc-PABA-MMAF)<sub>2</sub> (prodotti della catena pesante fra 51032 e 51500 Da picco maggiore di 51181 Da corrispondente alla catena pesante con GalNazGlcNac(Fuc) del nucleo coniugato a BCN-vc-PABA-MMAF, ±95% della catena pesante totale, e un picco minore a 50407 Da a causa della frammentazione del linker di PABA durante la spettrometria di massa, ±5% della catena pesante totale).

*Esempio 24. coniugazione di BCN-MMAF 38 a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

**[0338]** Trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub>: l'incubazione di BCN-MMAF **38** con trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (100 µM) nella soluzione salina al fosfato (PBS) per approssimativamente 16 ore ha portato ad una conversione completa in Trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub> (prodotti della catena pesante fra 50636 e 51100 Da picco maggiore di 50783 Da corrispondente alla catena pesante con GalNazGlcNac(Fuc) del nucleo coniugato a BCN-MMAF).

*Esempio 24-2. Coniugazione di BCN-MMAF 57 a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

**[0339]** Trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub>: l'incubazione di BCN-MMAF (**57**, Figura 10b) con trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (100 µM) nella soluzione salina al fosfato (PBS) per approssimativamente 16 ore ha portato ad una conversione completa in trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub> (prodotti della catena pesante fra 50636 e 51100 Da picco maggiore di 50783 Da corrispondente alla catena pesante con GalNazGlcNac(Fuc) del nucleo coniugato a BCN-MMAF **57**).

*Esempio 25. Coniugazione di BCN-vc-PABA3-maitansinoide 39 a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>*

**[0340]** L'incubazione di BCN-vc-PABA-maitansinoide (**39**) (800 µM, 2 x 4 eq) con trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (100 µM) nella soluzione salina al fosfato (PBS) per approssimativamente 40 ore ha portato ad una conversione completa in trastuzumab(vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub> (prodotti della catena pesante fra 50781 e 51600 Da picco maggiore di 51172 Da corrispondente alla catena pesante con GalNazGlcNac(Fuc) del

nucleo coniugato a BCN-vc-PABA-maitansinoide,  $\pm 95\%$  della catena pesante totale).

*Coniugazione di coniugati cicloottino-doxorubicina 42-44 a trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> mediante cicloadizione promossa mediante deformazione*

[0341] Ad una soluzione di trastuzumab-(GalNAz)<sub>2</sub> (7,5  $\mu$ L, 20 mg/ml, 1 nmol) nella  
 5 soluzione salina al fosfato (PBS) è stata aggiunta una soluzione di cicloottino (2,5  $\mu$ L, 2,4 mM 5 % DMF in MiliQ, 6 nmol). La reazione è stata ruotata da estremità a estremità seguita dall'analisi AccuTOF.

*Esempio 26: coniugazione di MCFO-doxorubicina 42 a trast(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0342] Dopo 5 giorni in conformità all'analisi AccuTOF conversione dell'80%. Massa  
 10 osservata 50548, massa prevista 50550.

*Esempio 27: coniugazione di DIBO-doxorubicina 43 a trast(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0343] Dopo 5 giorni in conformità all'analisi AccuTOF conversione del 30 %. Massa  
 osservata 50530, massa prevista 50544.

*Esempio 28: coniugazione di cicloottino-doxorubicina 44 a trast(GalNAz)<sub>2</sub>*

[0344] Dopo 5 giorni in conformità all'analisi AccuTOF conversione del 50 %. Massa  
 15 osservata 50434, massa prevista 50449.

*Esempio 29: CuAAC di trastuzumab-(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub> con alchino-biotina 45*

[0345] Ad una soluzione di trast-(GalNAz)<sub>2</sub> (10  $\mu$ L, 9,6 mg/ml, 0,64 nmol) (derivato da  
 52) nella soluzione salina al fosfato (PBS) è stata aggiunta una soluzione di biotina-  
 20 alchino (45,1  $\mu$ L, 10 mM, 10 nmol) e una premiscela di materia prima (1  $\mu$ L, 10 mM di CuSO<sub>4</sub>, 10 mM di ascorbato di sodio, 10 mM di tris((1-((O-etil)carbrossimetil)-(1,2,3-triazole-4-il))metilammina in 20 % di MeCN in miliQ). La reazione è stata ruotata da estremità a estremità durante la notte, dopodiché l'analisi AccuTOF ha mostrato la formazione completa del prodotto desiderato (massa osservata 50195), come indicato  
 25 nella figura 17.

*Esempio 30: CuAAC di trastuzumab-ina<sub>2</sub> con azoturo-biotina 46*

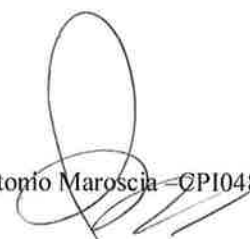
[0346] Ad una soluzione di trast-(GalNAc-ina)<sub>2</sub> derivata da **53** (10 µL, 9,6 mg/ml, 0,64 nmol) nella soluzione salina al fosfato (PBS) è stata aggiunta una soluzione di biotina-N<sub>3</sub> **46** (1 µL, 10 mM, 10 nmol) e una premiscela di materia prima (1 µL, 10 mM di CuSO<sub>4</sub>, 10 mM di ascorbato di sodio, 10 mM di tris(((O-etil)carbrossimetil)-(1,2,3-triazolo-4-il))metilammina in 20 % di MeCN in miliQ). La reazione è stata ruotata da estremità a estremità durante la notte e la successiva analisi AccuTOF ha mostrato il 50 % di conversione (massa 50353, massa prevista 50351), come indicato nella figura 18.

*Esempio 31: coniugazione di maleimmide-vc-PABA-maitansinoide 40 a trastuzumab(N297C)*

[0347] Trastuzumab(N297C) (4 mg, 10 mg/mL) è stato incubato con DTT (10 eq) in PBS a pH 7.4 per 2 ore a 22 °C. L'eccesso di DTT è stato rimosso mediante la purificazione del filtro di rotazione e IgG ridotto (10 mg/mL) è stato incubato con acido deidroascorbico (20 eq) per 3 ore a 22 °C. Maleimmide-vc-PABA-maitansinoide **40** (3 eq) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 1 ora, dopodiché l'eccesso di maleimmide-vc-PABA-maitansinoide **40** è stato rimosso mediante la purificazione con filtro a rotazione. L'analisi AccuTOF ha mostrato la formazione di tre prodotti della catena pesante, che corrispondono alla catena pesante non modificata (49133 Da, ±10% della catena pesante totale), la catena pesante coniugata a 1 maitansinoide (50454 Da, ±85% della catena pesante totale) e la catena pesante coniugata a 2 maitansinoidi (50774 Da, ±5% della catena pesante totale). Nessuna coniugazione alla catena leggera è stata rilevata.

*Esempio 32: prova di stabilità del plasma in vitro*

[0348] Il plasma umano (preparato usando eparina) è stato centrifugato a 200 g per 10 minuti a 4°C e il surnatante è stato incubato con agarosio proteina A (Kem-En-Tec) per




1 ora a 4°C, per eseguire la deplezione per IgG. Il plasma sottoposto a deplezione è stato sterilizzato con filtro usando un filtro di 0,22 µm (Whatman). Il coniugato trastuzumab-doxorubicina derivato da **28a** è stato aggiunto al plasma umano sterile ad una concentrazione finale di 100 µg/ml e incubato a 37 °C in un'incubatrice di CO<sub>2</sub> per  
5 mantenere i livelli di pH del plasma vicini al pH fisiologico di 7.2. I campioni sono stati prelevati a 0, 24, 48 e 144 ore e stoccati a -80°C. Il coniugato trastuzumab è stato purificato con agarosio proteina A seguito dall'analisi della spettrometria di massa (MS). I campioni del plasma umano sono stati incubati con agarosio proteina A per 1 ora a 4°C, lavati tre volte con soluzione salina al fosfato (PBS) e il coniugato di trastuzumab è stato eluito con  
10 100 mM di glicina-HCl a pH 2.7 seguito da neutralizzazione con 1 M di Tris-HCl a pH 8.0. L'analisi della spettrometria di massa (MS) ha mostrato che il picco corrispondente al coniugato trastuzumab-doxorubicina (50708 Da) non diminuiva nel tempo.

In aggiunta, non si è potuto rilevare nessun picco corrispondente ai prodotti di degradazione, dimostrando che il coniugato è stabile per almeno 144 ore nel plasma  
15 umano.

*Esempio 33: efficacia in vitro*

[0349] Le cellule SK-Br-3 (Her2+), SK-OV-3 (Her2+) e MDA-MB-231 (Her2-) sono state piastrate in piastre a 96 pozzetti (5000 cellule/pozzetto) in RPMI 1640 GlutaMAX (Invitrogen) integrato con 10% di siero di vitello fetale (FCS) (Invitrogen, 200  
20 µl/pozzetto) e incubate durante la notte a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Una serie di diluizioni triple (comprese fra ±0,002 e 100 nM) dei composti filtrati in modo sterile è stata preparata in RPMI 1640 GlutaMAX integrato con 10% di FCS. Dopo la rimozione del mezzo di coltura, le serie di concentrazioni sono state aggiunte in quadruplo e incubate per tre giorni a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Il mezzo di coltura è stato sostituito da 0,01 mg/mL di resazurina  
25 (Aldrich di Sigma) in RPMI 1640 GlutaMAX integrato con 10% di FCS. Dopo un periodo



da 4 a 6 ore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> la fluorescenza è stata rilevata con un lettore di piastre a fluorescenza (Tecan Infinite 200) a 540 nm di eccitazione e 590 nm di emissione.

Le unità fluorescenti relative (RFU) sono state normalizzate alla percentuale di vitalità cellulare mediante settaggio dei pozzetti senza cellule allo 0% di vitalità e dei pozzetti con  
5 dose minima di composto al 100% di vitalità. Per ciascuna delle condizioni è mostrata la percentuale di vitalità cellulare media ± sem.

**[0350]** La citotossicità *in vitro* di trastuzumab-(vc-PABA-MMAE)<sub>2</sub> (derivato da **37a**),  
trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)<sub>2</sub> (derivato da **37b**), trastuzumab-(vc-PABA-  
maitansinoide)<sub>2</sub> (derivato da **39**), trastuzumab-(maitansinoide)<sub>2</sub> e trastuzumab(N297C)-  
10 (vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub> (derivato da **40**) sono state comparate al T-DMI come controllo positivo e trastuzumab e rituximab-(vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub> come controlli negativi. Tutti gli ADC a base di trastuzumab influenzano la vitalità delle linee cellulari positive a Her2 SK-Br-3 e SK-OV-3, ma non della linea cellulare negativa a Her2 MDA-MB-231, il che mostra che questi ADC bersagliano specificamente le cellule positive a  
15 Her2. Nella linea cellulare negativa a Her2 MDA-MB-231, soltanto T-DMI mostra una diminuzione leggera nella vitalità cellulare alla massima concentrazione (100 nM).

*Esempio 34: coniugazione di DTPA, radiomarcatura e determinazione di IRF*

**[0351]** Il trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub> (derivato dalla coniugazione di trast(GalNAz)<sub>2</sub> e **37b**) e  
trastuzumab(maitansinoide)<sub>2</sub> (derivato dalla coniugazione di trast(GalNAz)<sub>2</sub> e **39**),  
20 trastuzumab deglicosilato (ottenuto dal trattamento di trastuzumab e endo S) e trastuzumab nativo sono stati coniugati con isotiocianato-DTPA (Macrocyclics, Houston, TX) e marcati con <sup>111</sup>In (Covidien, Petten). Per gli esperimenti animali, tutti i costrutti sono stati marcati ad un'attività specifica fra 2,7 e 3,4 MBq/μg.

*Esempio 35: studi PK/biodistribuzione*

25 **[0352]** Topi nudi BALB/c (n=15) sono stati inoculati per via sottocutanea con 5 x 10<sup>6</sup>

SK-OV-3 cellule (volume di iniezione: 200  $\mu$ l) nel fianco destro. 14 giorni dopo l'induzione tumorale, gruppi di cinque topi sono stati iniettati I.v. con 15-20 MBq di anticorpo marcato con  $^{111}\text{In}$ , marcato ad una dose proteica di 25  $\mu$ g. Per accertare la stabilità *in vivo* e la farmacocinetica dei coniugati, 50  $\mu$ l campioni di sangue sono stati prelevati per mezzo di un'emorragia submandibolare 0,5, 1,30 min, 1,2 e 4 ore, e 1, 2, 5, 7, 9, 13, 16 e 21 giorni dopo l'iniezione dei preparati di anticorpo radiomarcati.

*Esempio 36: biodistribuzione*

[0353] Una settimana dopo l'iniezione (3 giorni p.i.) i topi sono stati sottoposti ad eutanasia e sezionati per determinare la biodistribuzione della radio marcatura in tessuti pertinenti.

10 La distribuzione del tessuto di trastuzumab(MMAF)<sub>2</sub> (derivato da **37b**), trastuzumab(maitansinoide)<sub>2</sub> (derivato da **39**) e trastuzumab deglicosilato è comparabile con il trastuzumab nativo.

*Esempio 37: efficacia in vivo*

[0354] Topi femmina SHO (CrI:SHO-Prkdcscid Hrhr, da 6 a 9 settimane all'inizio della fase sperimentale, ottenuti dai laboratori di Charles River Laboratories, L'Arbresles, Francia) sono stati anestetizzati con chetamina/xilazina, la pelle è stata aseptizzata con una soluzione di clorexidina, incisa al livello della regione scapolare, un frammento tumorale di 20 mm<sup>3</sup> (HBCx-13B cancro al seno derivato dal paziente modello di xenotrapianto) è stato posto nel tessuto sottocutaneo e la pelle è stata chiusa con clip. Quando il volume tumorale era nel range da 60 a 200 mm<sup>3</sup>, gruppi di quattro topi sono stati iniettati I.v. o con veicolo, trastuzumab-(vc-PABA-maitansinoide)<sub>2</sub> (derivato da **39**, a 3 mg/kg e 9 mg/kg), trastuzumab-(vc-PABA-MMAF)<sub>2</sub> (derivato da **37b**, a 3 mg/kg e 9 mg/kg), e T-DM1 (9 mg/kg).

*Analisi spettrometrica di massa dettagliata di trastuzumab e derivati*

25 [0355] Trastuzumab nativo, trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub>, e coniugati di biotina preparati da

trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> mediante chimica click catalizzata da rame (coniugazione con **46** secondo il protocollo descritto nell'esempio 29) o mediante chimica click promossa da deformazione (coniugazione con **25** come descritto nell'esempio 16) sono stati sottoposti all'analisi degli spettri di massa dettagliata di specie di proteina intatte (nanoLC-MS) usando nanoIC accoppiato a QTOF MS a risoluzione ultra elevata (maXis 4G).

*Esempio 38: analisi di proteina intatta*

Preparazione dei campioni

[0356] La riduzione proteica è stata effettuata per 30 minuti in 10 mM di DTT a 56 °C.

I campioni sono stati diluiti 1:1 in 2% di acido formico prima dell'analisi.

10 Cromatografia in fase liquida- spettrometria di massa

[0357] Le separazioni proteiche sono state effettuate usando una cromatografia in fase liquida di nanoflusso UHPLC (Bruker Daltonics nano advance) accoppiata in linea ad uno spettrometro di massa a tempo di volo quadripolare a risoluzione ultra elevata (Bruker Daltonics maXis 4G ETD) mediante una sorgente di elettrospray assistita sottovuoto di desolvatazione assiale (spruzzatore captivo Bruker Daltonics). Le proteine sono state caricate sulla colonna di intrappolamento (Dionex PepSwift, 0,2 x 5 mm) in 3 minuti a una portata di 5000 NL/min usando 0,1% di acido formico. Le proteine sono state separate su una colonna di particella monolitica 0,2 x 150 mm (Michrom 8µm 4000Å PLRP-S) a 50°C usando un gradiente lineare da 20 a 50 % acetonitrile e 0,1% di acido formico ad una portata di 1000 NL/min. La desolvatazione e ionizzazione di peptidi in eluizione dalla colonna è stata effettuata usando 6 L/min gas di azoto a 180 °C e 1600 V di tensione capillare. Lo spettrometro di massa è stato calibrato esternamente usando miscela di sintonizzazione Agilent (G1969-85000) e calibrazione lockmass è stata usata al 1221,9906 m/z (Agilent G1982-85001). Lo spettrometro di massa è stato programmato per spettri acquisiti nel range da 500-4200 m/z a 1 Hz con i seguenti settaggi: 400 Vpp



imbuto RF, 10 eV isCID, 400 Vpp multipolo RF, 8 eV energia di ione quadripolare, 510 m/z messa privata, 10 eV energia cellulare di collisione, 3500 Vpp collisione RF, 110  $\mu$ s tempo di trasferimento, 450 Vpp refrigeratore ionico RF e 18  $\mu$ s stoccaggio preimpulso.

#### Elaborazione dati

- 5 [0358] Tutti i dati sono stati elaborati nel software di analisi di dati. Dopo la calibrazione lockmass, gli spettri MS dia della catena pesante che leggera sono stati calcolati in media su ciascun picco cromatografico, rispettivamente. Gli spettri calcolati in media sono stati deconvoluti usando l'algoritmo di entropia massima in combinazione con l'algoritmo di selezione di picco SNAP per lo spettro della catena leggera o di selezione del picco di  
10 somma per lo spettro della catena pesante.

*Esempio 39* analisi peptidica proteolitica

#### Preparazione del campione

- [0359] Da ciascun campione, cinque microgrammi di proteina sono stati sottoposti a digestione triptica in soluzione. Brevemente, è stata effettuata una riduzione in 10 mM  
15 DTT per 30 minuti a 56 °C. L'alchilazione di cisteine ridotte (carbamidometilazione) è stata effettuata usando 50 mM di cloroacetammide. La digestione proteica è stata prima effettuata mediante l'aggiunta di 0,5  $\mu$ g LysC peptidasi e l'incubazione per 3 ore a 37 °C. Poi, 800 ng di tripsina sono stati aggiunti al campione e incubati O/N a 37 °C. I peptidi proteolitici risultanti sono stati concentrati e dissalati usando punte di eluizione a fermata  
20 e ripartita a intermittenza.

#### Cromatografia in fase liquida - spettrometria di massa in tandem

- [0360] Le separazioni peptidiche sono state effettuate usando un cromatografo liquido di nanoflusso UHPLC (Bruker Daltonics nano advance) accoppiato in linea ad una trappola ionica a capacità elevata (Bruker Daltonics amaZon speed ETD) per mezzo di una sorgente  
25 di elettrospray assistito sottovuoto di desolvatazione assiale (spruzzatore captivo Bruker



Daltonics). I peptidi sono stati caricati sulla colonna di intrappolamento (Dionex PepSwift, 0,2 x 5 mm) in 3 minuti ad una portata di 5000 NL/min usando 0,1% di acido formico. I peptidi sono stati separati su una colonna monolitica 0,1 x 250 mm (Dionex PepSwift) a 60°C usando un gradiente lineare da 5 a 25% di acetonitrile e 0,1% di acido formico ad una portata di 800 NL/min. La desolvatazione e ionizzazione di peptidi in eluizione dalla colonna è stata effettuata usando 3 L/min gas di azoto a 150 °C e 1300V di tensione capillare. Lo spettrometro di massa è stato programmato per acquisire uno spettro di sondaggio singolo (MS) con analisi della frammentazione dipendente da dati successivi (MS/MS) dei 6 ioni superiori maggiormente abbondanti. Gli spettri di sondaggio sono stati acquisiti ad una modalità di risoluzione aumentata e sono stati usati i seguenti settaggi di strumento: 50 MS tempo di accumulo massimo, 500.000 bersaglio ICC, tono al 1000 m/z, 5 medie di spettri. Gli spettri di frammentazione sono stati acquisiti nella modalità di scansione estrema con autoselezione della modalità di frammentazione abilitata che commuta fra metodi di frammentazione di dissociazione indotta da collisione (CID) e dissociazione da trasmissione elettronica (ETD) sulla base del rapporto di massa rispetto alla carica e stato della carica dello ione precursore. I seguenti settaggi dello strumento sono stati usati per scansioni di frammentazione: 500.000 bersaglio ICC, 200 MS tempo di accumulo massimo, SPS abilitato, 70 % di energia CID e 0,2 min di esclusione dinamica.

#### 20 Ricerche del database

[0361] I dati della spettrometria di massa grezzi acquisiti sono stati elaborati mediante il software di analisi di dati (Bruker Daltonics, v4.1) per generare file di input compatibili Mascot (formato GMF). I file GMF sono stati caricati in software ProteinScape (Bruker Daltonics, V3.1) e ricercati su un database sequenziale usando il software di ricerca del database Mascot. Il database di sequenze fasta conteneva le sequenze di proteina a catena



pesante e leggera di trastuzumab con sequenze di proteina contaminante aggiunte (per es. LysC, Tripsina e cheratine). Le ricerche sono state effettuate usando i seguenti settaggi: 0,35 Da tolleranza di massa del precursore, 0,35 Da tolleranza di massa dello ione di frammento, specificità triptica con un massimo di 2 clivaggi mancati, carbamidometilazione (C) come modificazione fissata. Le seguenti modifiche variabili sono state specificate: ossidazione (MHW), deamidazione (NQ), carbamilazione (K + termine N) e acetilazione (termine N proteico). I peptidi con punteggi di ioni Mascot al di sopra della soglia di punteggio di identità sono stati accettati come identificazioni valide (tasso di scoperta di falsi peptidi < 1%).

10 Quantificazione relativa

[0362] Per la proteina della catena pesante di trastuzumab, un peptide singolo con ossidazione di istidina (sequenza K.FNWiVDGVEVH\*NAK.T, con H11 ossidato) è stato esclusivamente identificato in coniugato di trastuzumab ottenuto mediante coniugazione catalizzata da rame di 46, ma non ne è stato rilevato nessuno negli altri campioni. I cromatogrammi a corrente di ione estratti (EIC) per il peptide con e senza istidina ossidata (EIC:  $847.46 \pm 0,5$  m/z e EIC:  $839,97 \pm 0,5$  m/z, rispettivamente) sono stati generati in software DataAnalysis. In aggiunta, i cromatogrammi EIC per i due peptidi successivi sono stati usati per scopi di normalizzazione: -.EVQLVESGGGLVQPGGSLR.L (EIC:  $941,6 \pm 0,5$  m/z) e K.GPSVFPLAPSSK.S (EIC:  $593.95 \pm 0,5$  m/z). Le aree di picco integrate da tre misurazioni di replicazione sono state calcolate in media e espresse in relazione a trastuzumab nativo, indicando che il frammento soprastante con istidina ossidata ammonta a 69% del totale di questo frammento particolare (31% del frammento non modificato).

[0363] Per la proteina della catena leggera di trastuzumab, un peptide singolo con ossidazione di metionina (sequenza .DIQM\*TQSPSSLSASVGDR.V, con M4ossidato) è



stato esclusivamente identificato in coniugato di trastuzumab ottenuto mediante coniugazione catalizzata da rame di **46**, ma non è stato rilevato nessuno negli altri campioni.

*Esempio 40: clonazione e espressione di mutanti GalT Y289N, Y289F, Y289M, Y289V, Y289A e Y289G e Y289I.*

**[0364]** I geni mutanti GalT sono stati amplificati da un costrutto contenente la sequenza di codificazione del dominio catalitico di GalT consistente di residui 130-402 aa, mediante il metodo PCR d'estensione in sovrapposizione. L'enzima di tipo selvatico è rappresentato dalla SEQ ID No: 17. Per il mutante Y289N (rappresentato dalla SEQ ID No: 18), il primo frammento di DNA è stato amplificato con un paio di primer: Oligo38\_GalT\_External\_Fw (CAG CGA CAT ATG TCG CTG ACC GCA TGC CCT GAG GAG TCC rappresentati dalla SEQ ID NO: 1) e Oligo19\_GalT\_Y289N\_Rw (GAC ACC TCC AAA **GTT** CTG CAC TAG GTA AGG GCT AAA rappresentati dalla SEQ ID NO: 2). Il sito di restrizione NdeI viene sottolineato, mentre il sito di mutazione è evidenziato in grassetto. Il secondo frammento è stato amplificato con un paio di primer: Oligo29\_GalT\_External\_Rw (CTG ATG GAT GGA TCC CTA GCT CGG CGT CCC GAT GTC CAC rappresentati dalla SEQ ID NO: 3) e Oligo18\_GalT\_Y289N\_Fw (CCT TAC GTG CAG **AAC** TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA rappresentati dalla SEQ ID NO: 4). Il sito di restrizione BamHI viene sottolineato, mentre il sito di mutazione è evidenziato in in grassetto. I due frammenti generati nella prima serie di PCR sono stati fusi nella seconda serie usando i primer Oligo38\_GalT\_External\_Fw e Oligo29\_GalT\_External\_Rw. Dopo la digestione con NdeI e BamHI. Questo frammento è stato ligato nel vettore pET16b separato con i medesimi enzimi di restrizione. Il vettore di espressione costruito di recente conteneva il gene di codificazione del mutante Y289N e la sequenza di codificazione per il marcatore His dal vettore pET16b, che è stato confermato dai risultati di sequenziamento di DNA.

Per la costruzione dei mutanti Y289F (rappresentato dalla SEQ ID No: 19), Y289M (rappresentato dalla SEQ ID No: 20), Y289I (rappresentato dalla SEQ ID No: 21), Y289V (rappresentato dalla SEQ ID No: 22), Y289A (rappresentato dalla SEQ ID No: 23) e Y289G (rappresentato dalla SEQ ID No: 24) è stato usato lo stesso procedimento, con i

5 siti di mutazione cambiati per le triplette **TTT, ATG, ATT, GTG, GCG** o **GGC** di codificazione per fenilalanina, metionina, isoleucina, valina, alanina o glicina, rispettivamente. Più specificamente, per la costruzione di Y289F il primo frammento di DNA è stato amplificato con un paio di primer definiti qui come SEQ ID NO: 1 e SEQ ID

10 No: 5 e il secondo frammento è stato amplificato con un paio di primer definiti qui come SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 6 (indicazione in tabella 1 per le sequenze relative). Inoltre, per la costruzione di Y289M il primo frammento di DNA è stato amplificato con un paio di primer definiti qui come SEQ ID NO: 1 e SEQ ID No: 7 e il secondo frammento è stato amplificato con un paio di primer definiti qui come SEQ ID No: 3 e SEQ ID No: 8 (indicazione in tabella 1 per le sequenze relative).

15 **[0365]** I mutanti GalT sono stati espressi, isolati e ripiegati da corpi di inclusione secondo il procedimento riportato da Qasba et al. (Prot. Expr. Pur. **2003**, 30,219-229). Dopo la ripiegatura, il precipitato è stato rimosso e la proteina piegata e solubile è stata isolata usando una colonna Ni-NTA (HisTrap excel 1 mL colonna, GE Healthcare). Dopo l'eluizione con 25 mM di Tris-HCl a pH 8.0, 300 mM di NaCl e 200 mM di imidazolo, la

20 proteina è stata dializzata contro 25 mM di Tris-HCl a pH 8.0 e concentrata a 2 mg/mL usando un filtro a rotazione (Unità di filtro centrifuga Amicon Ultra-15 con membrana Ultracel-10, Merck Millipore).

25

Tabella 1 Identificazione delle sequenze dei primer usati

<b>SEQ ID NO</b>	<b>Sequenza di nucleotidi</b>
SEQ ID NO: 1	CAG CGA <u>CAT ATG</u> TCG CTG ACC GCA TGC CCT GAG GAG TCC
SEQ ID NO: 2	GAC ACC TCC AAA <b>GTT</b> CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO: 3	CTG ATG GAT <u>GGA TCC</u> CTA GCT CGG CGT CCC GAT GTC CAC
SEQ ID NO: 4	CCT TAC GTG CAG <b>AAC</b> TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO: 5	GAC ACC TCC AAA <b>AAA</b> CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO: 6	CCT TAC GTG CAG <b>TTT</b> TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO: 7	GAC ACC TCC AAA <b>CAT</b> CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO: 8	CCT TAC GTG CAG <b>ATG</b> TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO: 9	GAC ACC TCC AAA <b>AAT</b> CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO: 10	CCT TAC GTG CAG <b>ATT</b> TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO: 11	GAC ACC TCC AAA <b>CAC</b> CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO: 12	CCT TAC GTG CAG <b>GTG</b> TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO: 13	GAC ACC TCC AAA <b>CGC</b> CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA



SEQ ID NO	Sequenza di nucleotidi
SEQ ID NO: 14	CCT TAC GTG CAG <b>GCG</b> TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO: 15	GAC ACC TCC AAA <b>GCC</b> CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO: 16	CCT TAC GTG CAG <b>GGC</b> TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA

*Esempio 41: trasferimento di UDP-GalNAz con mutanti GalT Y289N, Y289F e Y289M.*

[0366] L'introduzione enzimatica di derivato di galattosio su trastuzumab è stata effettuata con uno dei mutanti  $\beta(1,4)$ -Gal-T1 Y289N, Y289F o Y289M. Così, il trastuzumab deglicosilato (preparato come descritto in precedenza, 10 mg/mL) è stato incubato con  
 5 UDP-N azidoacetilgalattosammina **52** (UDP-GalNAz) (1 mM) e il rispettivo mutante  $\beta(1,4)$ -Gal-T1 (0,1 mg/mL) in 10 mM di  $MnCl_2$  e 25 mM di Tris-HCl a pH 8.0 per 16 ore a 30 °C.

[0367] Per tutti e tre i mutanti Y289N, Y289F o Y289M, l'analisi degli spettri di massa della miscela grezza ha indicato la conversione netta di trastuzumab sostituito da  
 10 GlcNAc(Fuc) del nucleo in trastuzumab(GalNAz)<sub>2</sub> (49713 Da, 90% della catena pesante totale).

#### ELENCO DELLE SEQUENZE

[0368]

<110> SynAffix B.V.

15 <120> Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof

<130> P6042904PCT  
 <150> EP12189604.7  
 <151> 2012-10-23  
 <150> US61/717,187  
 5 <151> 2012-10-23  
 <150> EP13188607.9  
 <151> 2013-10-14  
 <160> 24  
 <170> PatentIn version 3.3  
 10 <210> 1  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 15 <223> primer sequence  
 <400> 1  
 cagcgacata tgcgctgac cgcatgccct gaggagtcc 39  
 <210> 2  
 <211> 36  
 20 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> primer sequence  
 <400> 2  
 25 gacacctcca aagttctgca cgtaaggtag gctaaa 36

<210> 3  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> artificial  
5 <220>  
<223> primer sequence  
<400> 3  
ctgatggatg gatccctagc tcggcgtccc gatgtccac 39  
<210> 4  
10 <211> 36  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> primer sequence  
15 <400> 4  
ccttacgtgc agaactttgg aggtgtctct gctcta 36  
<210> 5  
<211> 36  
<212> DNA  
20 <213> artificial  
<220>  
<223> primer sequence  
<400> 5  
gacacctcca aaaaactgca cgtaaggtag gctaaa 36  
25 <210> 6

- <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 5 <223> primer sequence  
 <400> 6  
 ccttacgtgc agtttttgg aggtgtctct gctcta 36  
 <210> 7  
 <211> 36  
 10 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> primer sequence  
 <400> 7  
 15 gacacctcca aacatctgca cgtaaggtag gctaaa 36  
 <210> 8  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> primer sequence  
 <400> 8  
 ccttacgtgc agatgtttgg aggtgtctct gctcta 36  
 <210> 9  
 25 <211> 36

<212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> primer sequence  
 5 <400> 9  
 gacacctcca aaaatctgca cgtaaggtag gctaaa 36  
 <210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 10 <213> artificial  
 <220>  
 <223> primer sequence  
 <400> 10  
 ccttagctgc agattttgg aggtgtctct gctcta 36  
 15 <210> 11  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 20 <223> primer sequence  
 <400> 11  
 gacacctcca aacacctgca cgtaaggtag gctaaa 36  
 <210> 12  
 <211> 36  
 25 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
<223> primer sequence  
<400> 12  
ccttacgtgc aggtgittgg aggtgtctct gcteta 36  
5 <210> 13  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
10 <223> primer sequence  
<400> 13  
gacacctcca aacgcctgca cgtaaggtag gctaaa 36  
<210> 14  
<211> 36  
15 <212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> primer sequence  
<400> 14  
20 ccttacgtgc aggcgittgg aggtgtctct gcteta 36  
<210> 15  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> artificial  
25 <220>

- <223> primer sequence  
<400> 15  
gacacctcca aagccctgca cgtaaggtag gctaaa 36
- 5 <210> 16  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>
- 10 <223> primer sequence  
<400> 16  
ccttacgtgc agggccttgg aggtgtctct gctcta 36  
<210> 17  
<211> 402
- 15 <212> PRT  
<213> Bos taurus  
<400> 17



Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
 1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
 20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg  
 35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser  
 50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser  
 85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro  
 100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr  
 115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro  
 130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln  
 145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys  
 165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln  
 180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg  
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn  
 325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys  
 340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu  
 355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu  
 370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr  
385 390 395 400

Pro Ser

<210> 18

5 <211> 402

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> bos taurus GalT Y289N

10 <400> 18

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

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln  
 180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg  
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Asn Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn  
 325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys  
 340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu  
 355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu  
 370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr  
 385 390 395 400

Pro Ser

<210> 19

<211> 402

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> bos taurus GalT Y289F

<400> 19

10

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
 20 25 30  
 His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg  
 35 40 45  
 Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser  
 85 90 95  
 Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro  
 100 105 110  
 Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr  
 115 120 125  
 Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro  
 130 135 140  
 Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys  
 165 170 175  
 Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln  
 180 185 190  
 Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg  
 195 200 205  
 Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Phe Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn  
 325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys  
 340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu  
 355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu  
 370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr  
 385 390 395 400

Pro Ser

<210> 20

<211> 402

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> bos taurus GalT Y289M

<400> 20

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
1                    5                    10                    15  
10

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
 20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg  
 35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser  
 50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser  
 85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro  
 100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr  
 115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro  
 130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln  
 145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys  
 165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln  
 180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg  
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Met Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn  
 325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys  
 340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu  
 355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu  
 370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr  
 385 390 395 400

Pro Ser

<210> 21

<211> 402

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> bos taurus GalT Y289I

<400> 21

10

15



His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg  
 65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser  
 85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro  
 100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr  
 115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro  
 130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln  
 145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys  
 165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln  
 180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg  
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Ile Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320



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

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr  
 115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro  
 130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln  
 145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys  
 165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln  
 180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg  
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Val Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn  
 325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys  
 340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu  
 355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu  
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr  
385 390 395 400

Pro Ser  
<210> 23  
<211> 402  
<212> PRT  
<213> artificial

5 <220>

<223> bos taurus GalT Y289A

<400> 23

10

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

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys  
 165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln  
 180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg  
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Ala Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn  
 325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys  
 340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu  
 355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu  
 370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr  
 385 390 395 400

Pro Ser

<210> 24

<211> 402

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> bos taurus GalT Y289G

<400> 24



Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser  
 210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu  
 225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile  
 245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His  
 260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln  
 275 280 285

Gly Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile  
 290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp  
 305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn  
 325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys  
 340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu  
 355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu  
 370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr  
 385 390 395 400

Pro Ser

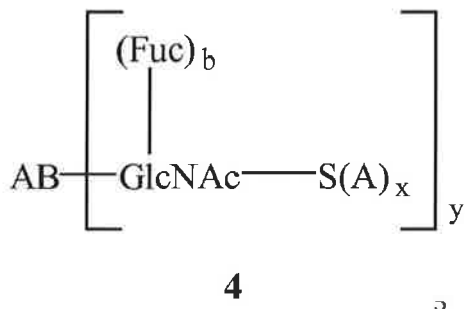
## Rivendicazioni

1. Processo per la preparazione di un coniugato di anticorpo, comprendente la reazione di un anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui detto coniugato di linker comprende un gruppo di (etero)cicloalchinile e una o più molecole di interesse, in cui detto anticorpo modificato è un anticorpo comprendente un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, in cui GlcNAc è una N-acetilglucosamina, in cui S(A)<sub>x</sub> è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A in cui A è un gruppo azoturo e x è 1, 2, 3 o 4, in cui detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> è legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosamina del detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detta GlcNAc è opzionalmente fucosilata.
2. Processo in conformità alla rivendicazione 1, comprendente le fasi di:
- (i) messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosamina del nucleo (GlcNAc) con un composto della formula S(A)<sub>x</sub>-P in presenza di un catalizzatore, in cui detto sostituito di N-acetilglucosamina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui S(A)<sub>x</sub> è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A in cui A è un gruppo azoturo e x è 1, 2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), per ottenere un anticorpo modificato, in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub> legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosamina del detto sostituito GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detto anticorpo modificato è in conformità alla Formula (4):

25



Ing. Antonio Maroseia - CPI048-BM



in cui:

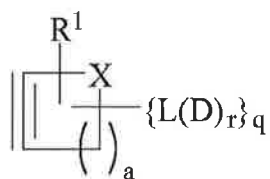
S(A)<sub>x</sub> e x sono come definiti in precedenza; AB rappresenta un anticorpo;  
 GlcNAc è N-acetilglucosammina; Fuc è fucosio; b è 0 o 1; e y è da 1 a 20;  
 e

10 (ii) reazione del detto anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui detto  
 coniugato di linker comprende un gruppo (etero)cicloalchinile e una o più molecole di  
 interesse.

3. Processo in conformità alla rivendicazione 1 o 2, in cui il catalizzatore è un catalizzatore  
 comprendente un dominio catalitico mutante da una β(1,4)-galattosiltransferasi,  
 15 preferibilmente selezionato dal gruppo consistente di GalT Y289L, GalT Y289N, GalT  
 Y289I, GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I e GalT  
 Y289A.

4. Processo in conformità ad una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 3, in cui detto coniugato  
 di linker ha la Formula (11) o (11b):

20




11

in cui:

25

L è un linker;

160



Ing. Antonio Maroscia - CPI048-BM

D è una molecola di interesse;

R è 1 - 20;

R<sup>1</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, -OR<sup>5</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, gruppi alchile C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi (etero)arile C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> e gruppi (etero)arilalchile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> e in cui i gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e i gruppi (etero)arilalchile sono opzionalmente sostituiti, in cui due sostituenti R<sup>1</sup> possono essere collegati assieme per formare un sostituente di cicloalchile con aggiunta di anello o di (etero)arene con aggiunta di anello, e in cui R<sup>5</sup> è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, gruppi (hetero)arile C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>, gruppi alchil(etero)arile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub> e gruppi di (etero)arilalchile C<sub>7</sub> - C<sub>24</sub>;

X è C(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>, O, S o NR<sup>2</sup>, in cui R<sup>2</sup> è R<sup>1</sup> o L(D)<sub>r</sub>, e in cui L, D e r sono come definiti in precedenza;


Q è 0 o 1, a condizione che se q è 0 allora X è N-L(D)<sub>r</sub>;

a è 0,1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8;

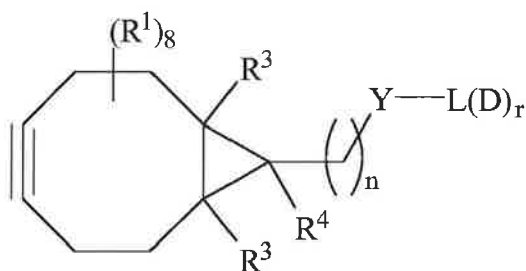
a' è 0,1, 2, 3, 4, 5, 6,7 o 8; e a+a' < 10.

5. Processo in conformità ad una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 4, in cui detto coniugato di linker ha la Formula (17):

25



Ing. Antonio Maroscia - CPI048-BM



5

17

in cui:

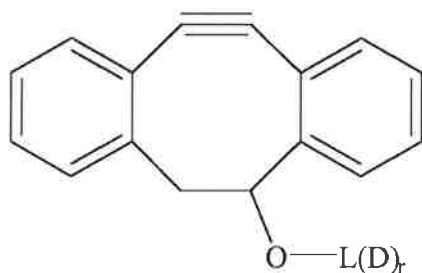
$R^1$ , L, D e r sono come definiti nella rivendicazione 4;

Y è O, S o  $NR^2$ , in cui  $R^2$  è come definito nella rivendicazione 4;

10  $R^3$  è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, alogeno, gruppi alchile  $C_1$ - $C_{24}$ , gruppi (etero)arile  $C_6$ - $C_{24}$ , gruppi alchil(etero)arile  $C_7$  -  $C_{24}$  e gruppi (etero)arilalchile  $C_7$  -  $C_{24}$ ;

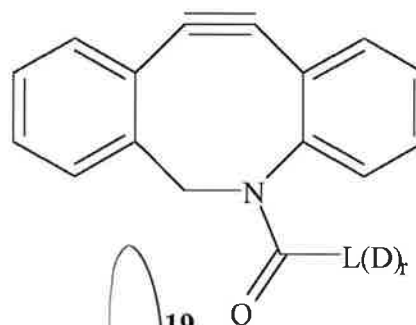
15  $R^4$  è selezionato dal gruppo consistente di idrogeno, Y-L(D)<sub>r</sub>,  $-(CH_2)_n$ -Y-L(D)<sub>r</sub>, alogeno, gruppi alchile  $C_1$  -  $C_{22}$ , gruppi (etero)arile  $C_6$ - $C_{24}$ , gruppi alchil(etero)arile  $C_7$  -  $C_{24}$  e gruppi (etero)arilalchile  $C_7$  -  $C_{24}$ , i gruppi alchile essendo opzionalmente interrotti da uno di più eteroatomi selezionati dal gruppo consistente di O, N e S, in cui i gruppi alchile, i gruppi (etero)arile, i gruppi alchil(etero)arile e i gruppi (etero)arilalchile sono indipendentemente opzionalmente sostituiti; e n è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 o 10,

20 o in cuiddetto coniugato di linker ha la Formula (15) o la Formula (19):



25

15



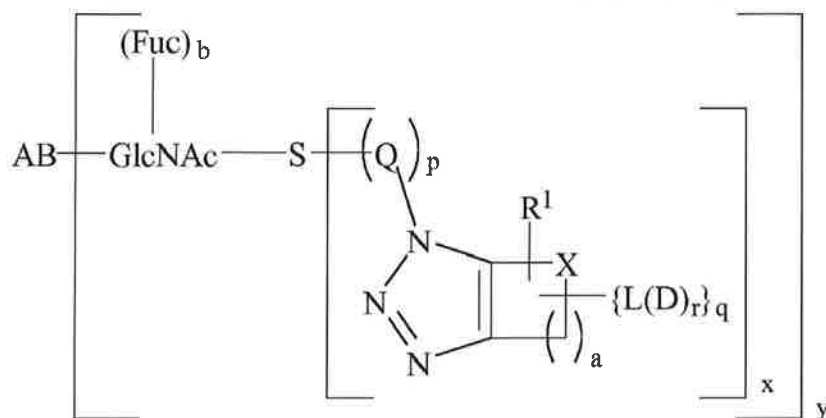
19

162

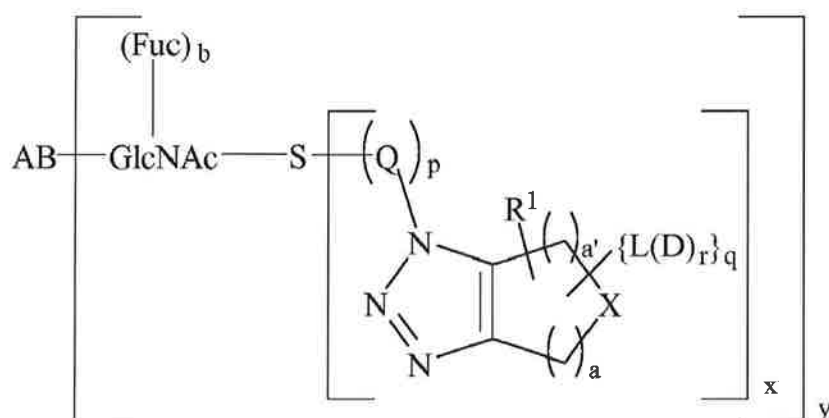
Ing. Antonio Maroscia - CPI048-BM

in cui L, D e r sono come definiti nella rivendicazione 4.

6. Coniugato di anticorpo secondo la Formula (20) o (20b):



20



20b

in cui:

L, D, X, R<sup>1</sup>, a, a', r e q sono come definiti nella rivendicazione 5;

b è 0 o 1;

p è 0 o 1;

25

Ing. Antonio Maroscia - CPI048-BM

Q è -N(H)C(O)CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-;

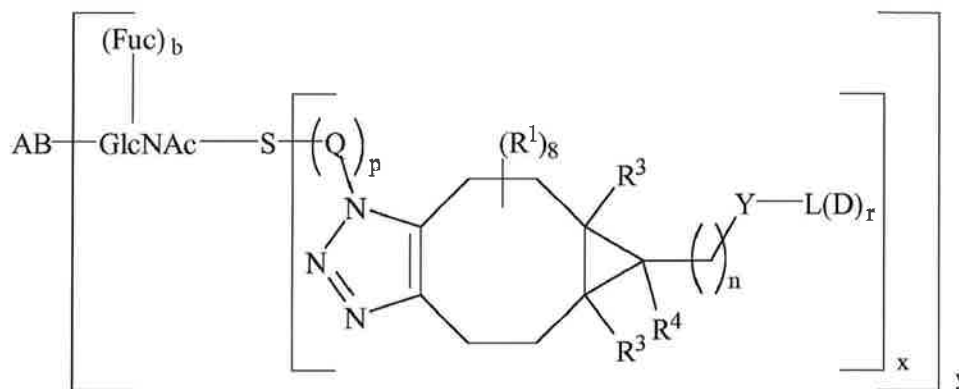
X è 1, 2, 3 o 4;

Y è 1 - 20;

e in cui AB è un anticorpo, S è uno zucchero o un derivato di zucchero, GlcNAc è

5 N-acetilglucosammina e Fuc è fucosio.

7. Coniugato di anticorpo in conformità alla rivendicazione 8, in cui il coniugato di anticorpo ha la Formula (21):

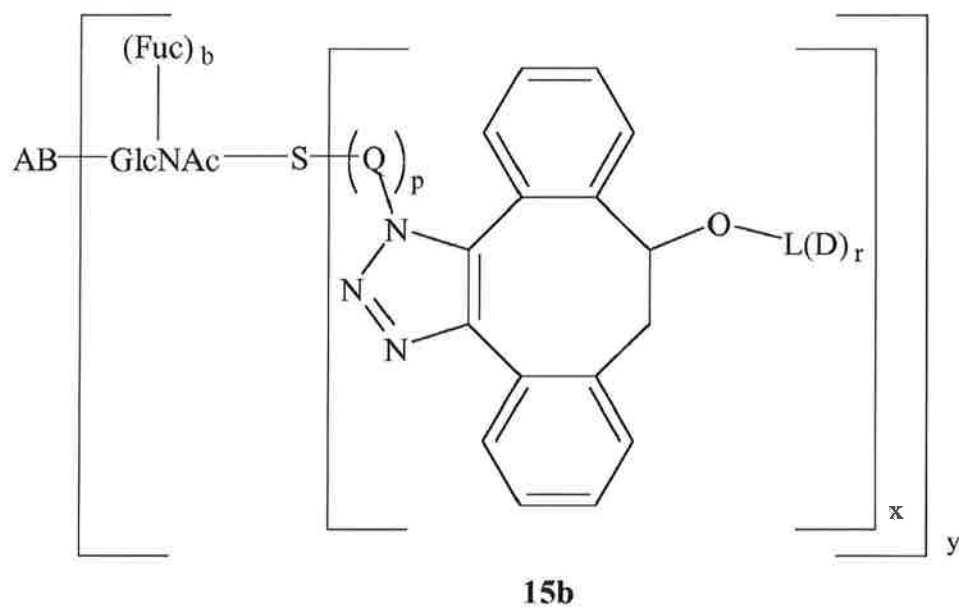


21

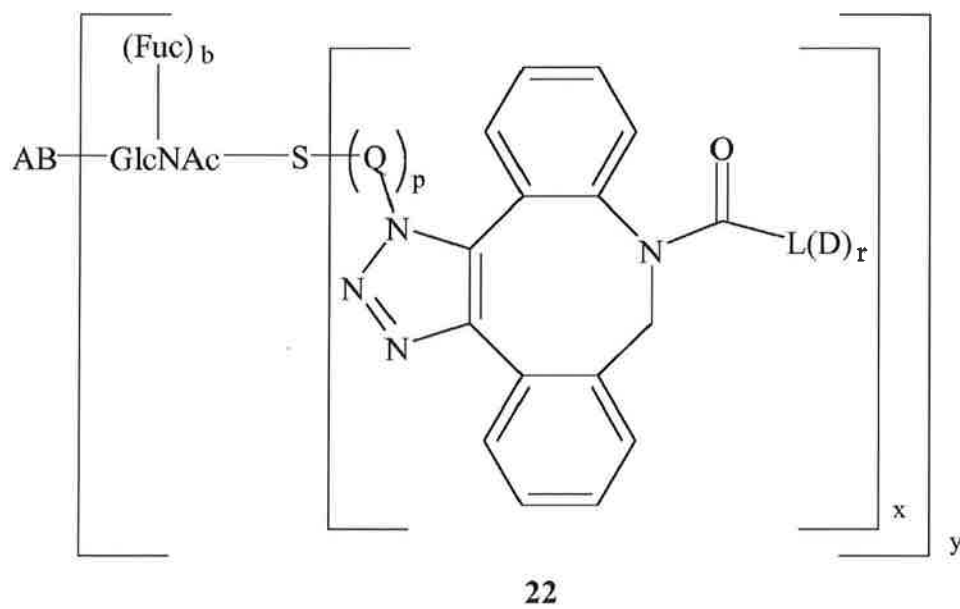
in cui AB, L, D, S, Q, y x, b, p, R<sup>1</sup> e GlcNAc sono come definiti nella rivendicazione 6, e

in cui R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, Y, n e r sono come definiti nella rivendicazione 4

o in cui il coniugato di anticorpo ha la Formula (15b) o la Formula (22):



15



165

  
 Ing. Antonio Maroscia - CPI048-BM

in cui AB, L, D, S, y x, b, p, Q e GlcNAc sono come definiti nella rivendicazione 6.

**8.** Coniugato di anticorpo in conformità ad una qualsiasi delle rivendicazioni 6 - 7, in cui detta molecola di interesse (D) è selezionata dal gruppo consistente di una sostanza che è biologicamente e/o farmaceuticamente attiva, una molecola reporter, un azoturo e un gruppo (etero)cicloalchinile.

**9.** Coniugato di anticorpo ottenibile mediante il processo in conformità ad una qualsiasi delle rivendicazioni 1 - 5.

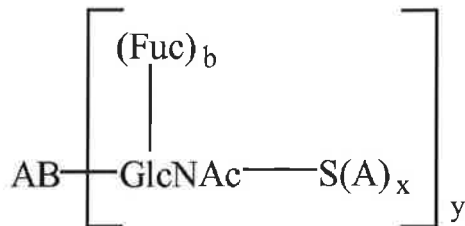
**10.** Coniugato di anticorpo in conformità ad una qualsiasi delle rivendicazioni 6 - 9 per l'uso come medicamento.

**11.** Coniugato di anticorpo in conformità ad una qualsiasi delle rivendicazioni 6 - 9 per l'uso nel trattamento del cancro, preferibilmente del cancro al seno, più preferibilmente del cancro al seno positivo a HER2.

**12.** Processo per la preparazione di un coniugato farmaco-anticorpo, comprendente le fasi di:

(i) messa a contatto di un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo (GlcNAc) con un composto della formula  $S(A)_x-P$  in presenza di un catalizzatore, in cui detto sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero comprendente x gruppi funzionali A in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchinile e x è 1, 2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP), per ottenere un anticorpo modificato, in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito  $GlcNAc-S(A)_x$  legato all'anticorpo per

mezzo di C1 della N-acetilglucosamina del detto sostituente GlcNAc-S(A)<sub>x</sub>, e in cui detto anticorpo modificato è in conformità alla Formula (4):



**4**

in cui:

10            S(A)<sub>x</sub> e x sono come definiti in precedenza; AB rappresenta un anticorpo;  
               GlcNAc è N-acetilglucosamina; Fuc è fucosio; b è 0 o 1; e y è da 1 a 20; e

(ii) reazione del detto anticorpo modificato con un coniugato di linker, in cui:

              (a) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da azoturo,  
               detto coniugato di linker comprende un gruppo di (etero)cicloalchinile o un  
 15            gruppo alchinile, e una o più molecole di interesse; o

              (b) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da chetone,  
               detto coniugato di linker comprende un gruppo ammina primaria, un gruppo  
               amminossi o un gruppo idrazinile, e una o più molecole di interesse; o

              (c) quando detto anticorpo modificato è un anticorpo modificato da alchino,  
 20            detto coniugato di linker comprende un gruppo azoturo, e una o più molecole  
               di interesse,

              in cui una molecola di interesse (D) è coniugata all'anticorpo per mezzo di un  
               linker (L); in cui detta molecola di interesse è una sostanza che è  
               biologicamente e/o farmaceuticamente attiva.

25

13. Coniugato farmaco-anticorpo ottenibile mediante il processo in conformità alla rivendicazione 12.

14. Processo per la preparazione di un anticorpo modificato, il processo comprendente:

5 (a) la deglicosilazione di un glicano di anticorpo avente una N-acetilglucosammina del nucleo, in presenza di un'endoglicosidasi, allo scopo di ottenere un anticorpo comprendente un sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo, in cui detto sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è opzionalmente fucosilato, in cui detto sostituito di N-acetilglucosammina del nucleo è legato per mezzo di un legame N-glicosidico all'atomo di azoto di amide nella catena laterale di un aminoacido di asparagina dell'anticorpo, e in cui detta endoglicosidasi è Endo S, 10 Endo S49, Endo F, o una combinazione delle stesse; seguita da

(b) messa a contatto del detto anticorpo con un composto della formula  $S(A)_x-P$  in presenza di un catalizzatore, in cui detto catalizzatore comprende un dominio catalitico mutante da una galattosiltransferasi, in cui  $S(A)_x$  è un derivato di zucchero 15 comprendente x gruppi funzionali A in cui A è indipendentemente selezionato dal gruppo consistente di un gruppo azoturo, un gruppo chetone e un gruppo alchilile e x è 1, 2, 3 o 4, in cui P è selezionato dal gruppo consistente di difosfato di uridina (UDP), difosfato di guanosina (GDP) e difosfato di citidina (CDP),

in cui un anticorpo modificato è definito come un anticorpo comprendente un sostituito 20 GlcNAc- $S(A)_x$  legato all'anticorpo per mezzo di C1 della N-acetilglucosammina del detto sostituito GlcNAc- $S(A)_x$ .

Si certifica la conformità al testo originale.

Il mandatario.

25

  
Ing. Antonio Maroscia - CPI048-BM

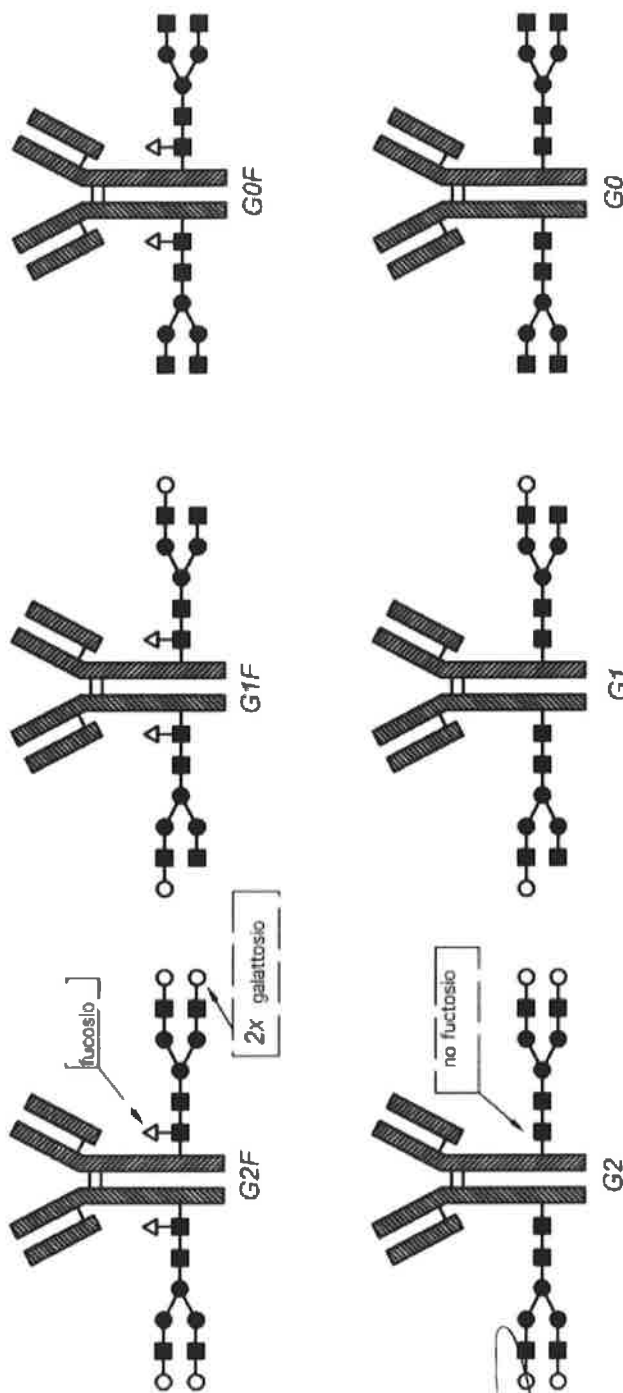


Fig. 1

Fig. 2

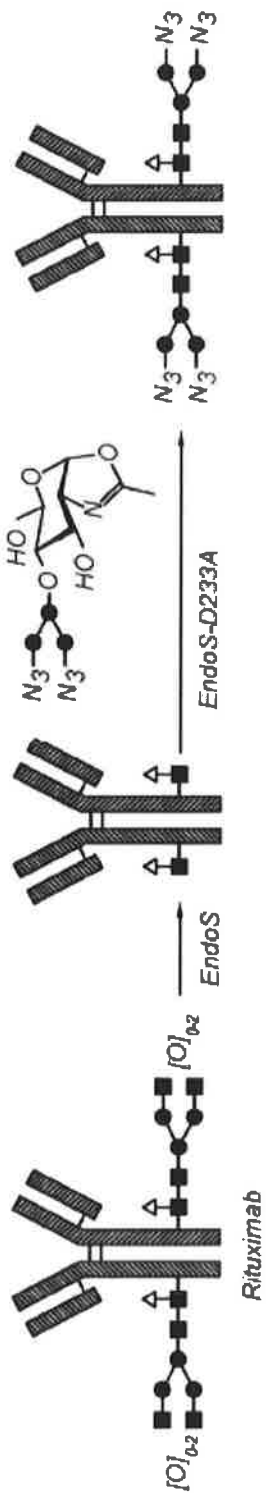


Fig. 3

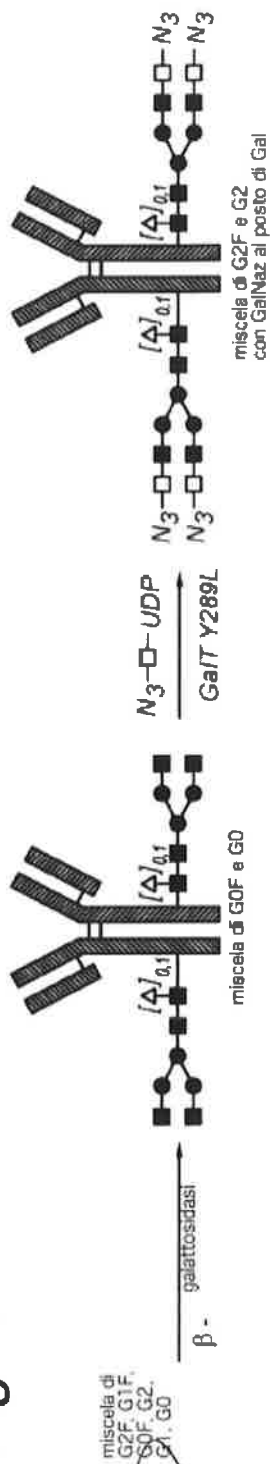
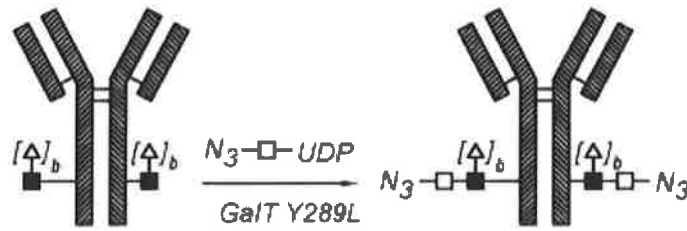


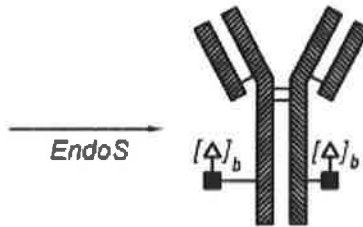
Fig. 4



miscela di mAb con  
GlcNAc e GlcNAc(Fuc);  
b = 0 o 1

Fig. 5

miscela di G2F, G1F,  
G0F, G2, G1, G0



miscela di MAb con  
GlcNAc e GlcNAc(Fuc);  
b = 0 o 1

Fig. 6

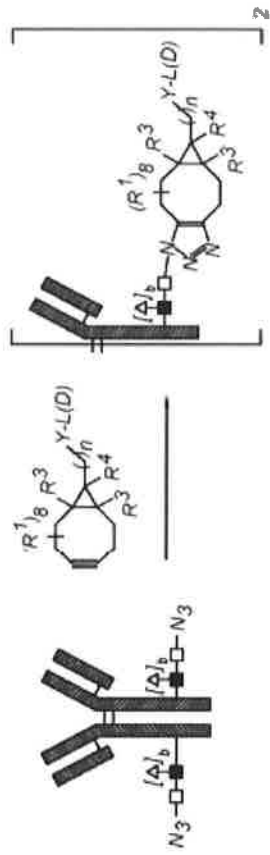
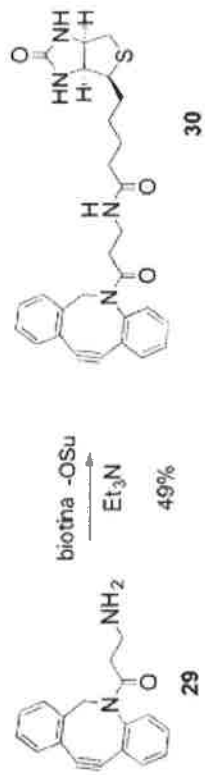
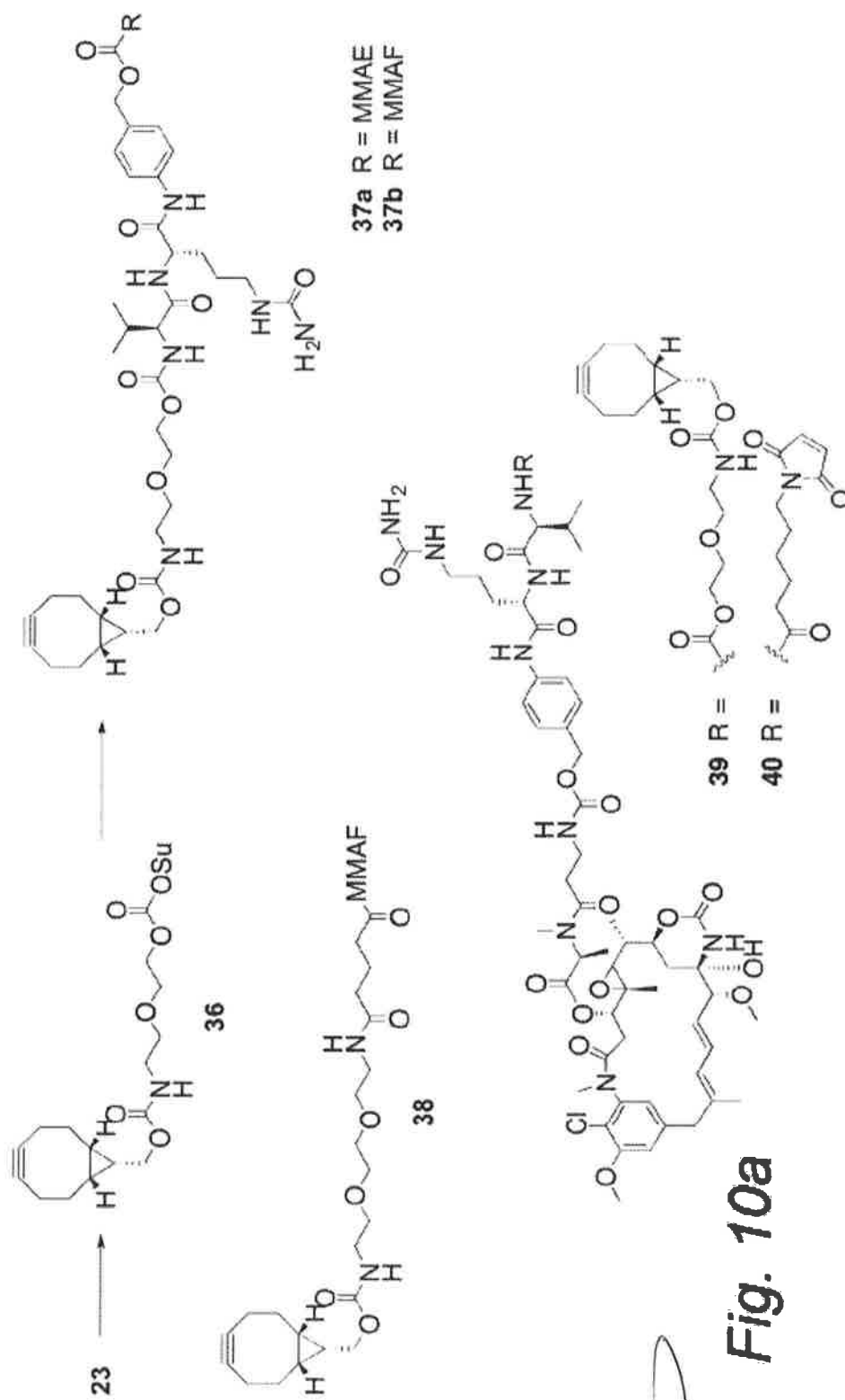


Fig. 8

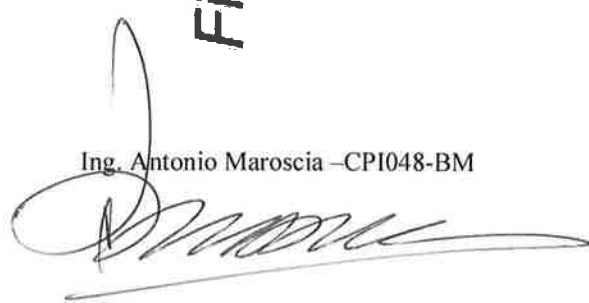








**Fig. 10a**



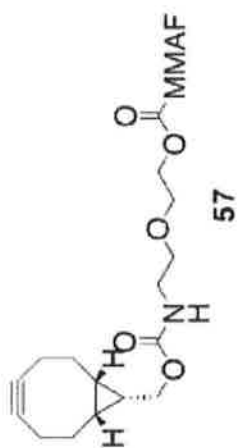


Fig. 10b

Fig. 11

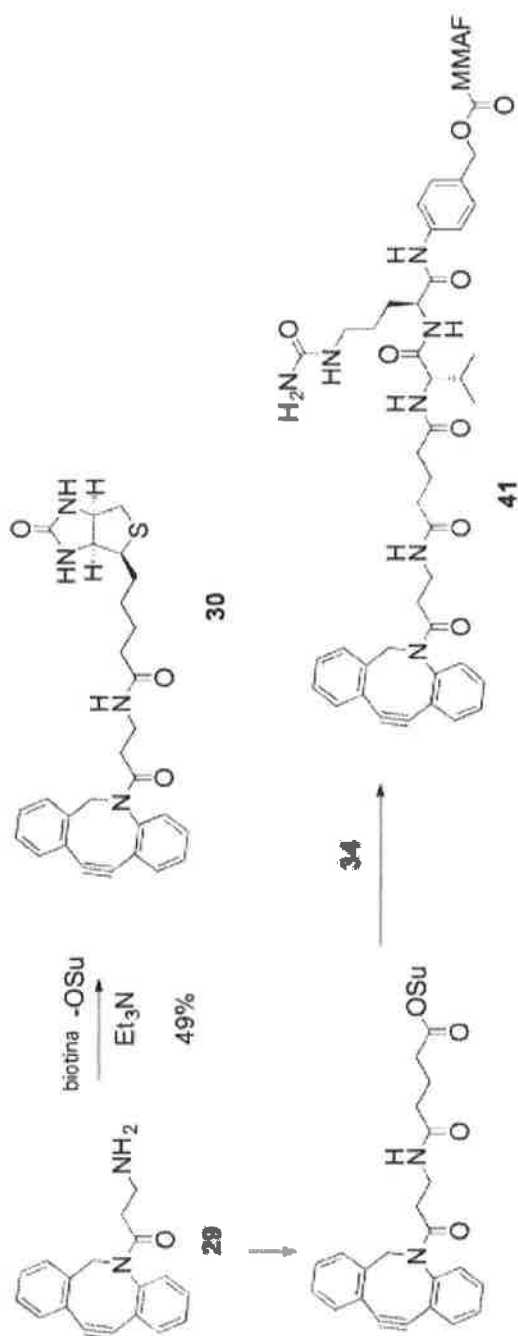


Fig. 12

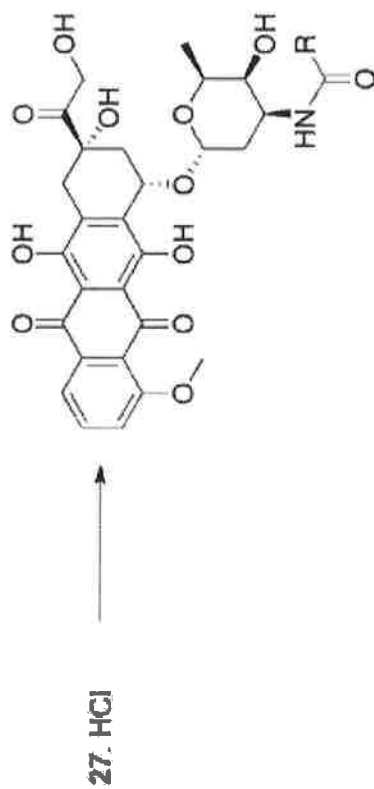
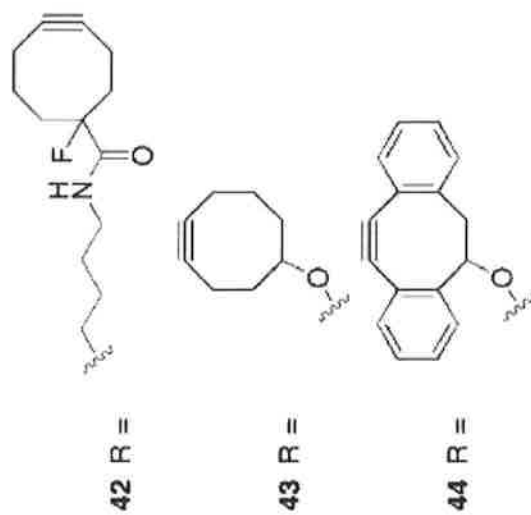


Fig. 13

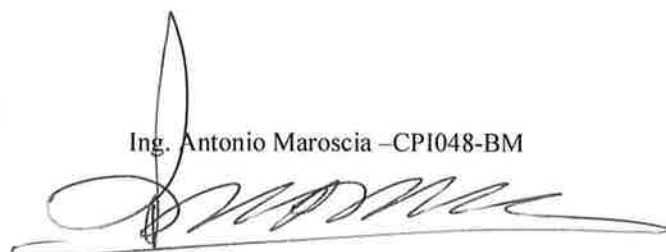
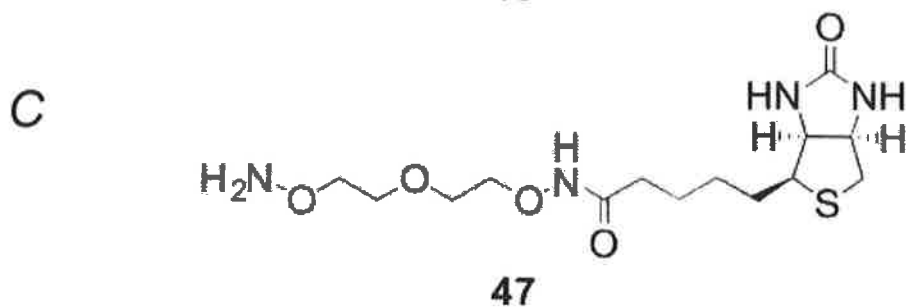
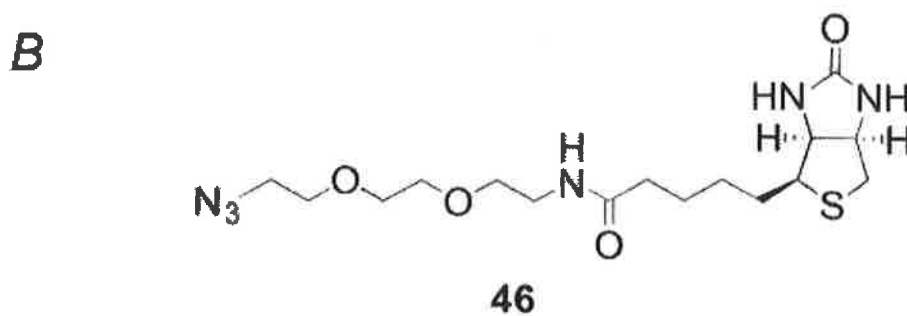
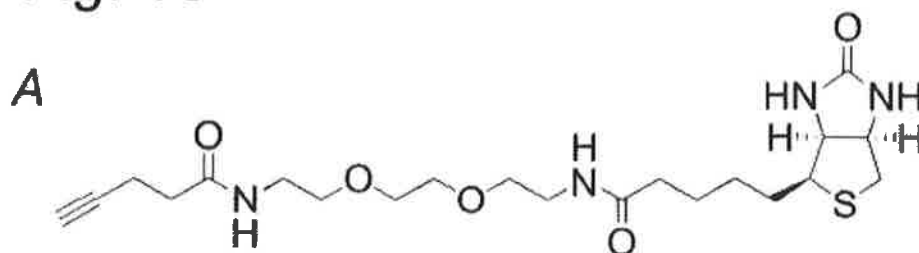
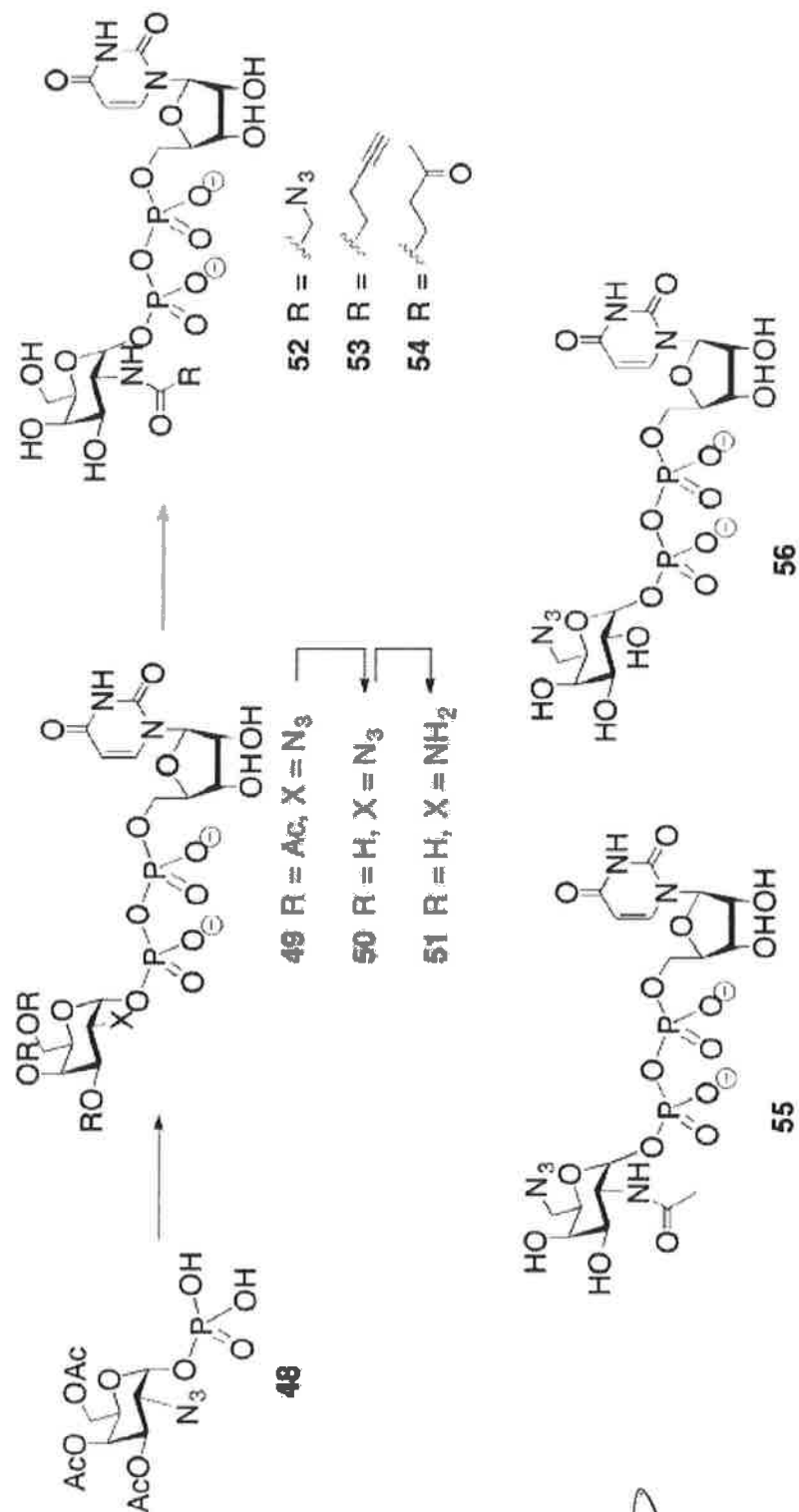
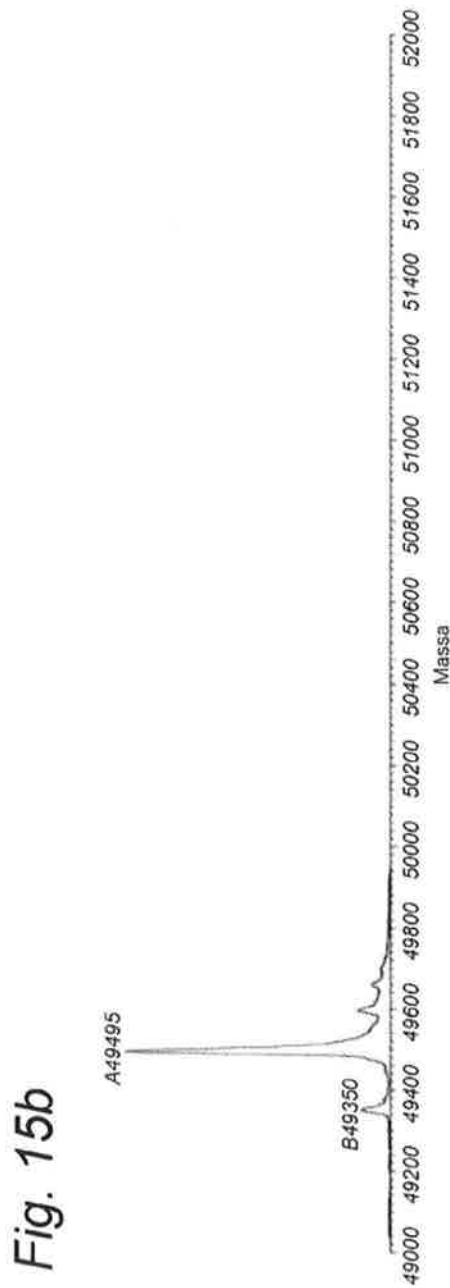
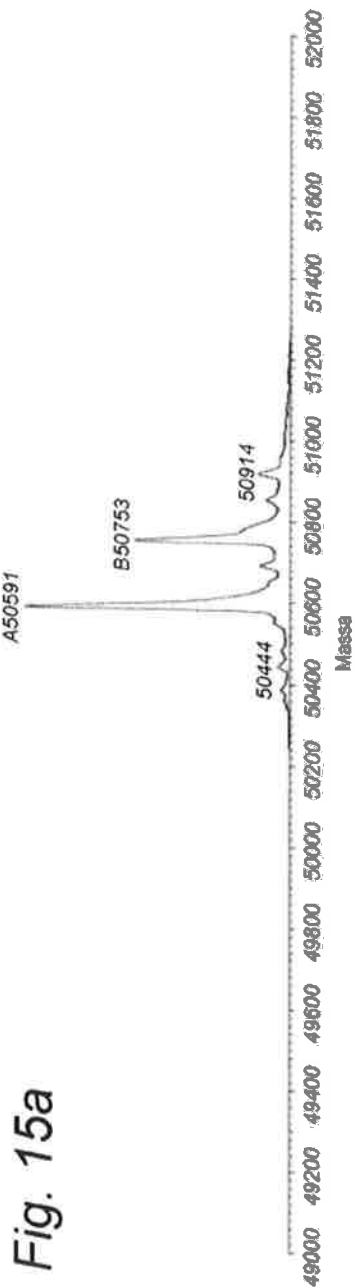


Fig. 14





Ing. Antonio Maroscia - CPI048-BM

Fig. 15c

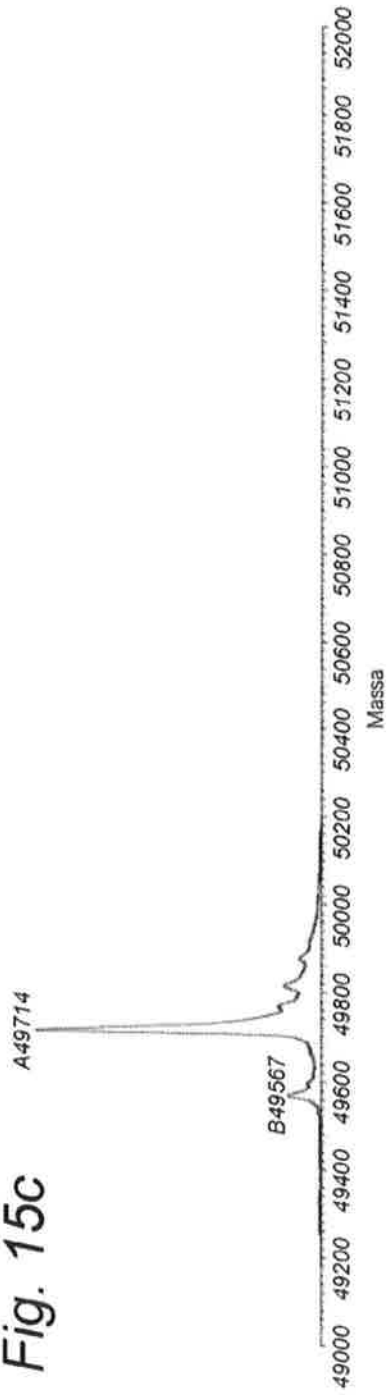


Fig. 15d

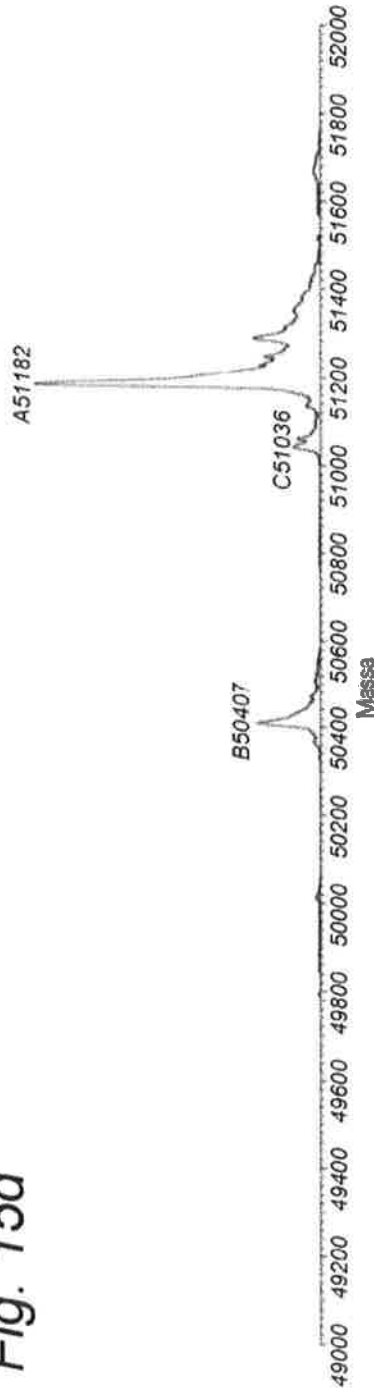


Fig. 16a

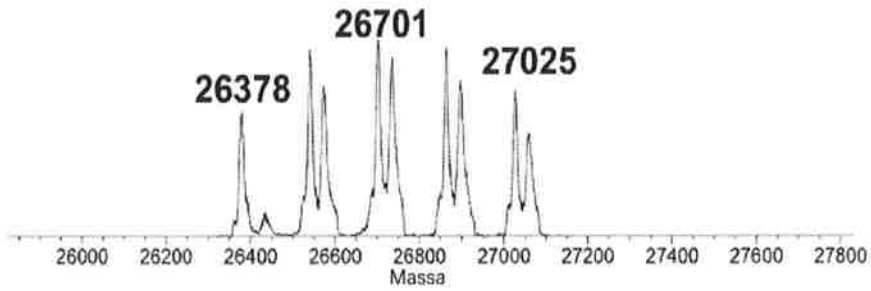


Fig. 16b

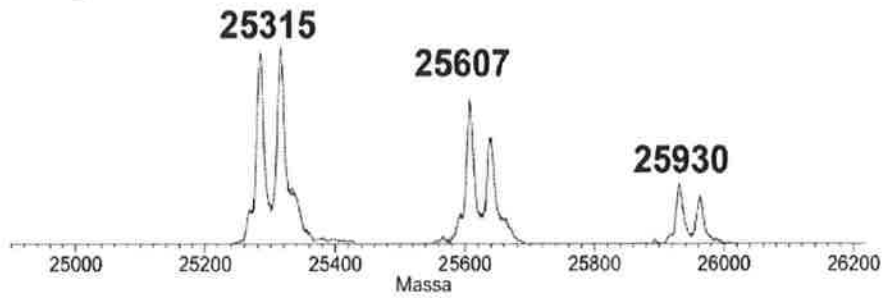
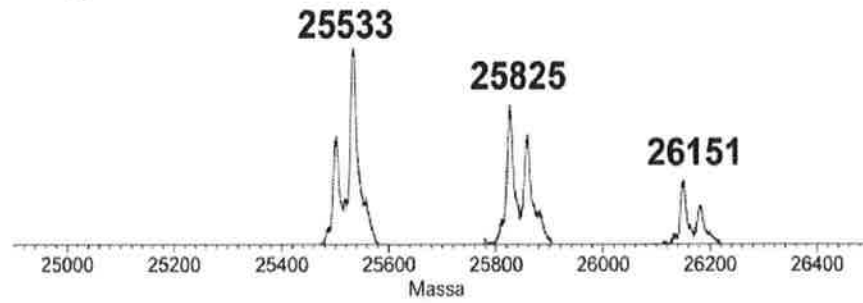


Fig. 16c



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Maroscia', is written over a horizontal line.

Fig. 17

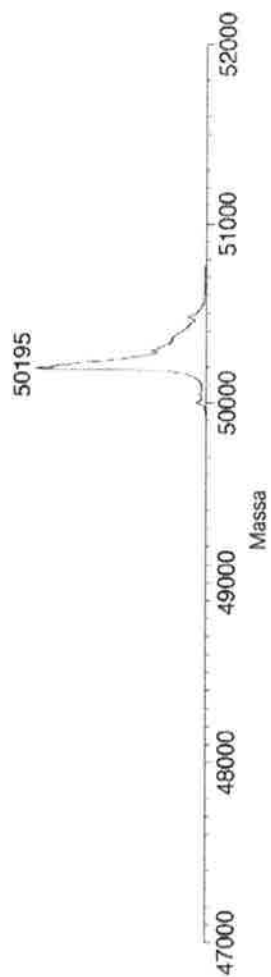


Fig. 18a

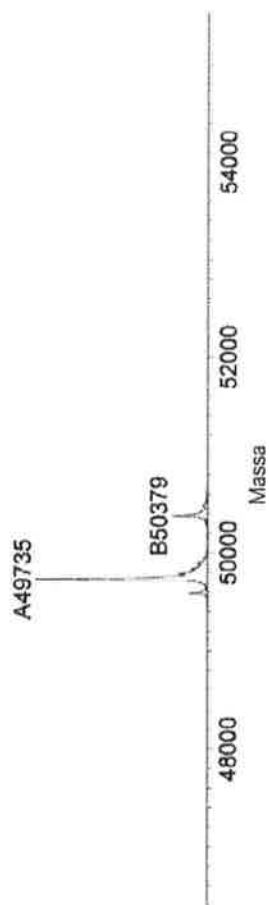
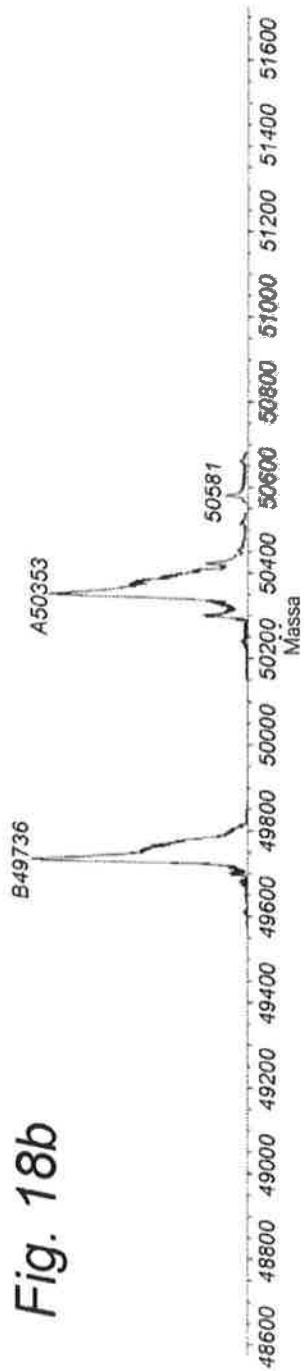


Fig. 18b



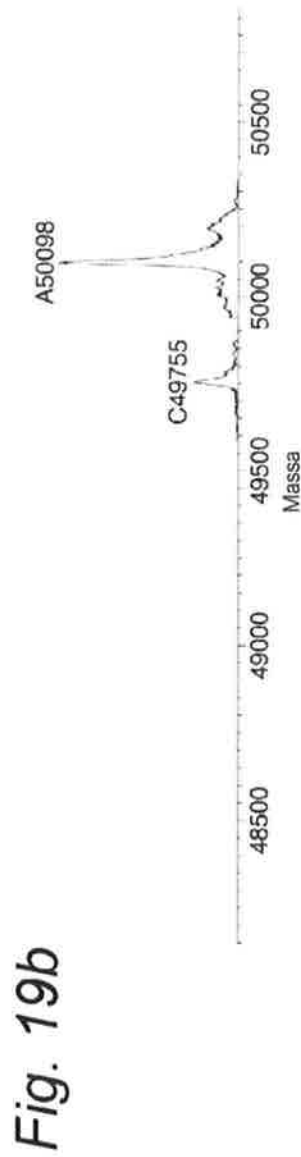
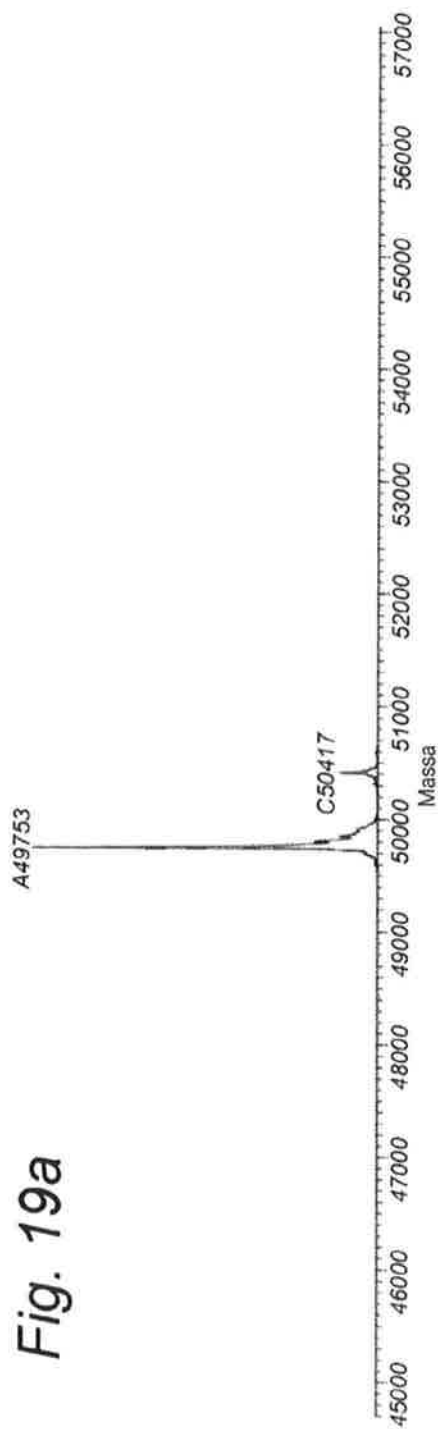


Fig. 20

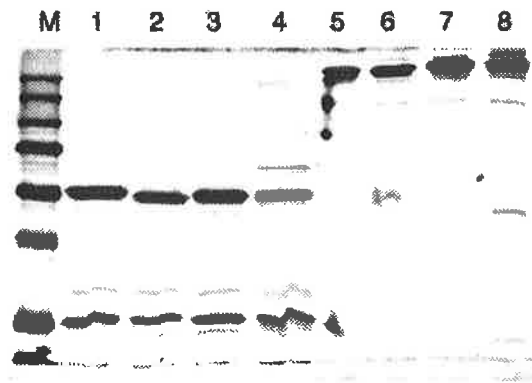
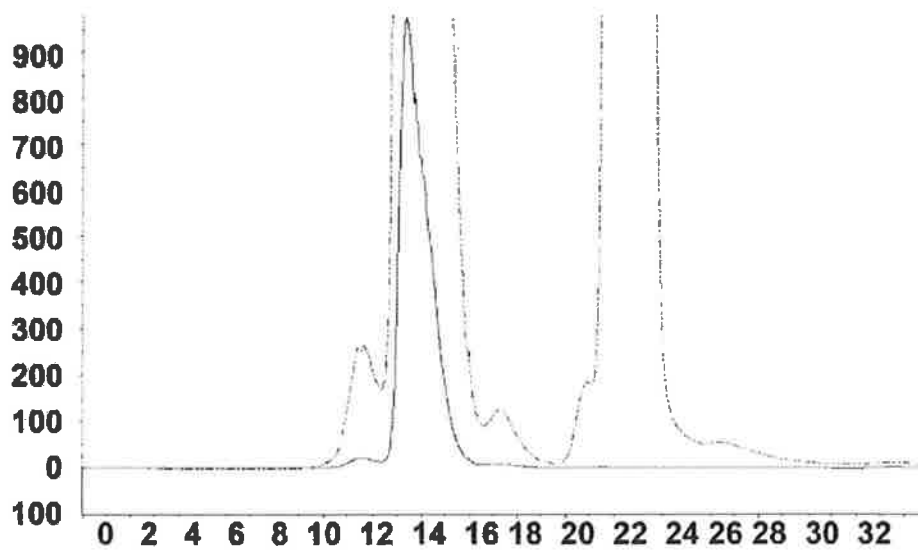


Fig. 21



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Maroscia', written over a horizontal line.

Fig. 22

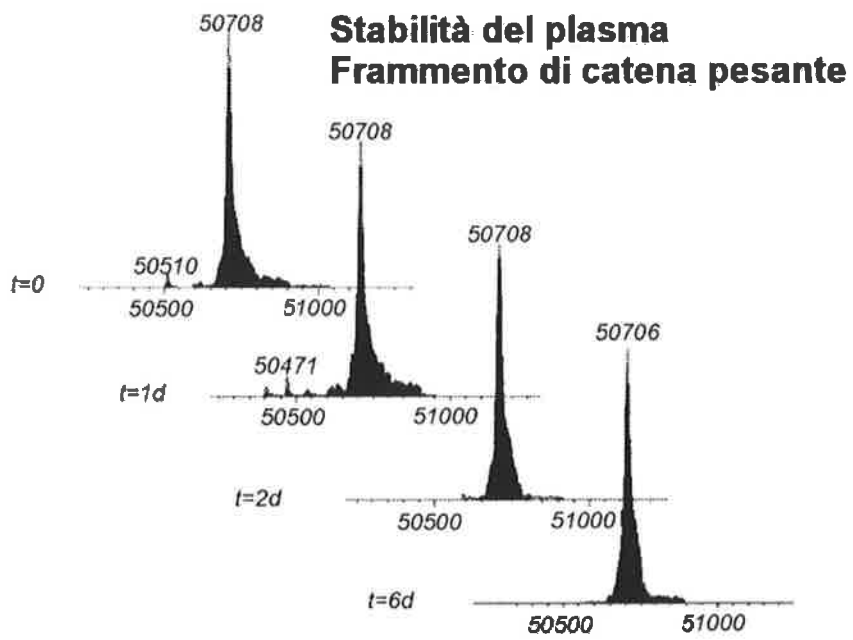


Fig. 23

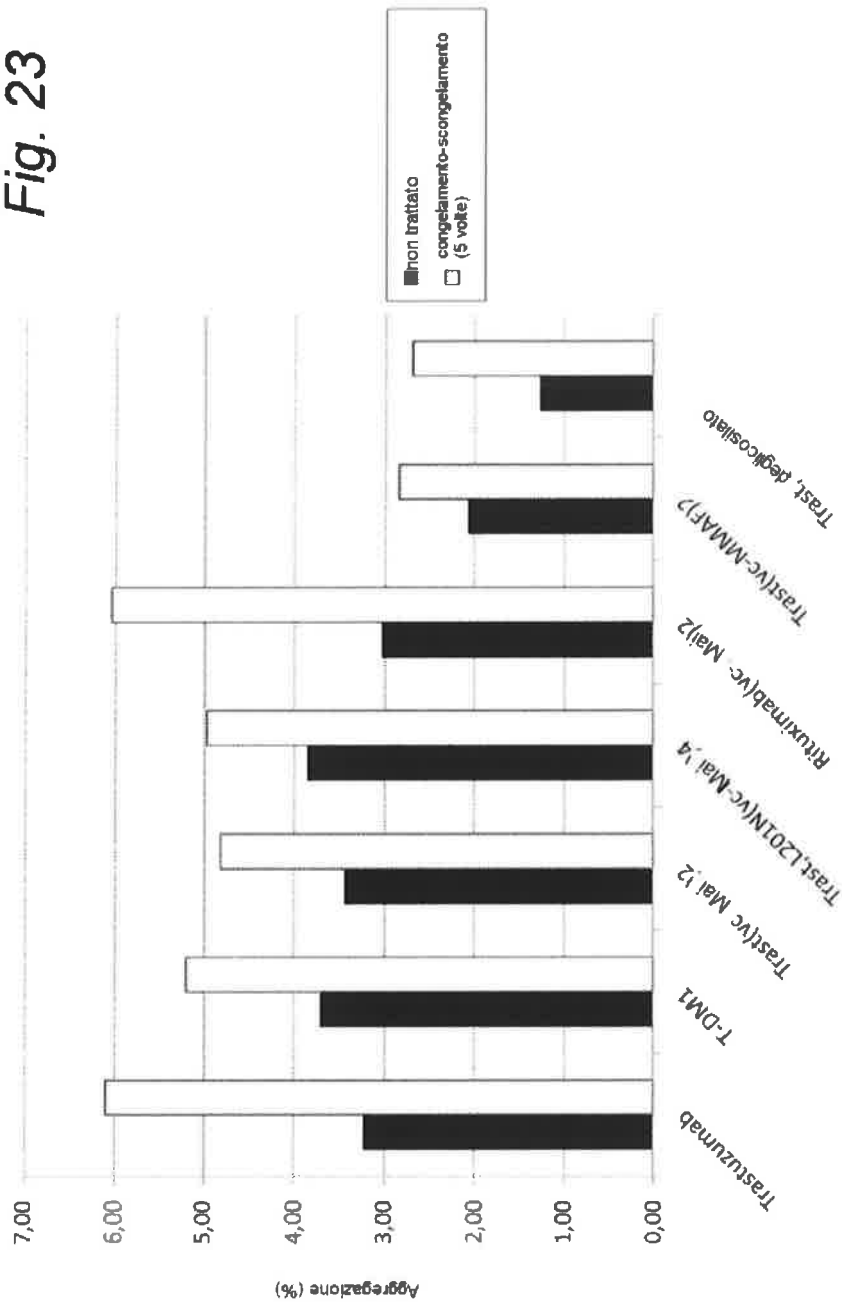


Fig. 24

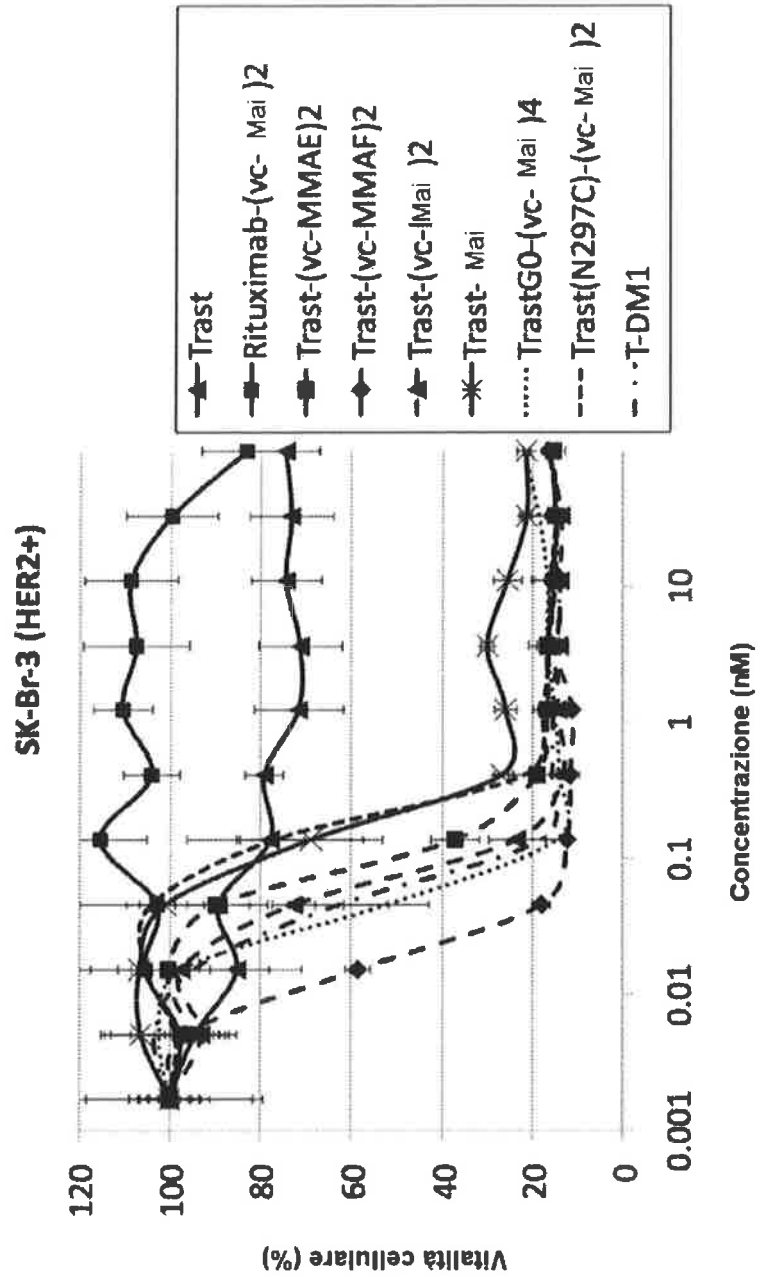


Fig. 25

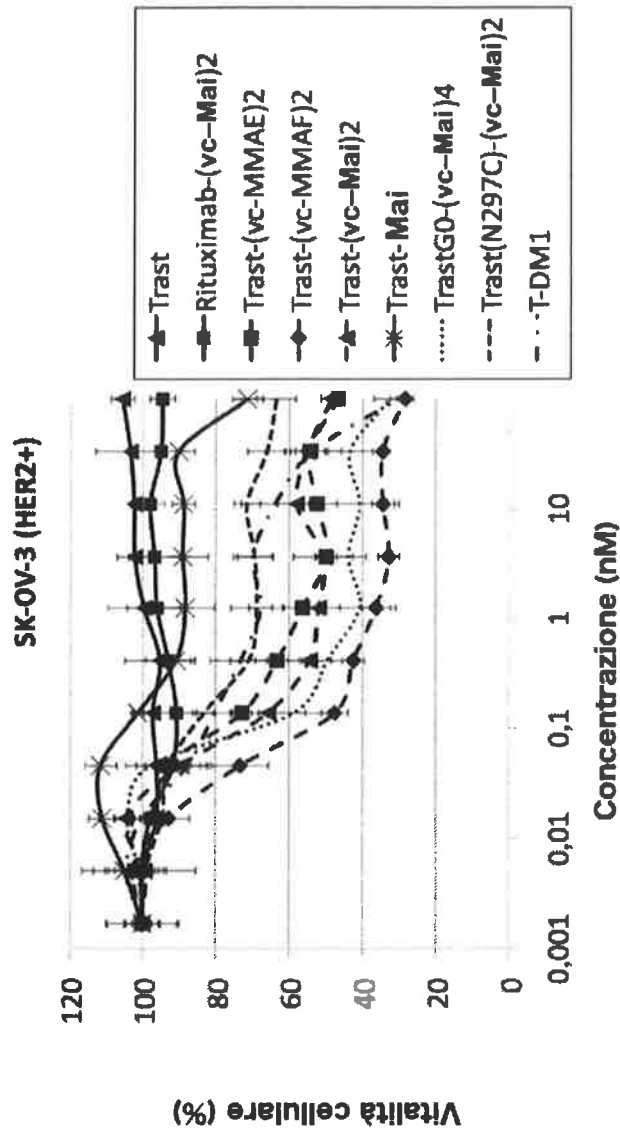
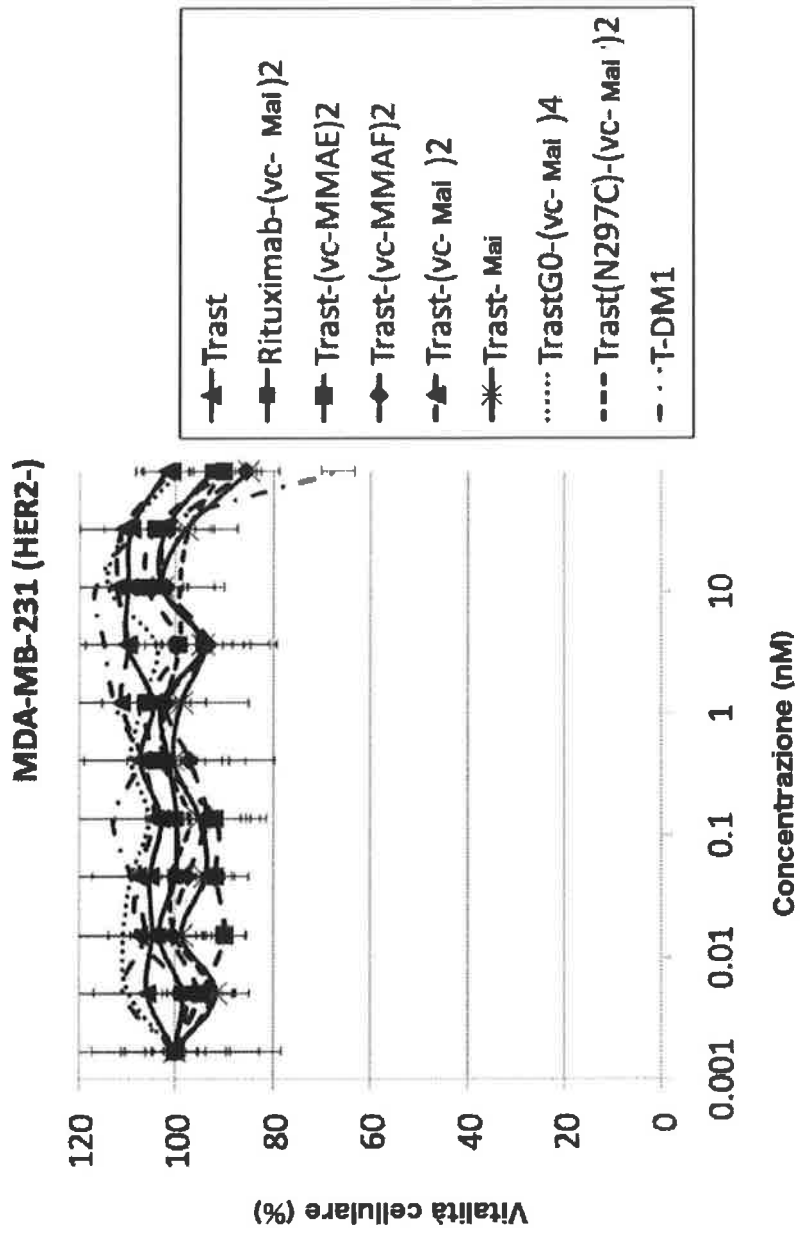
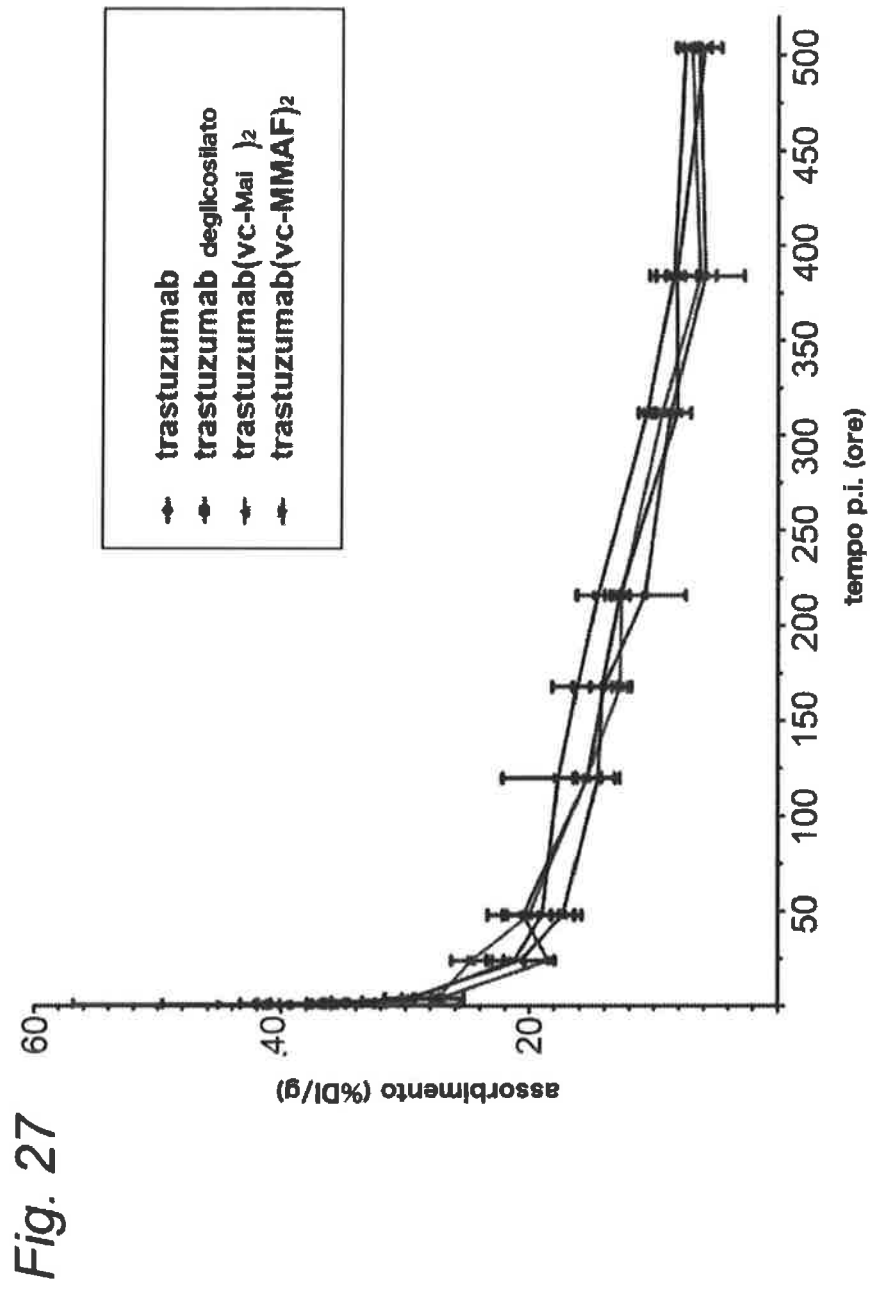
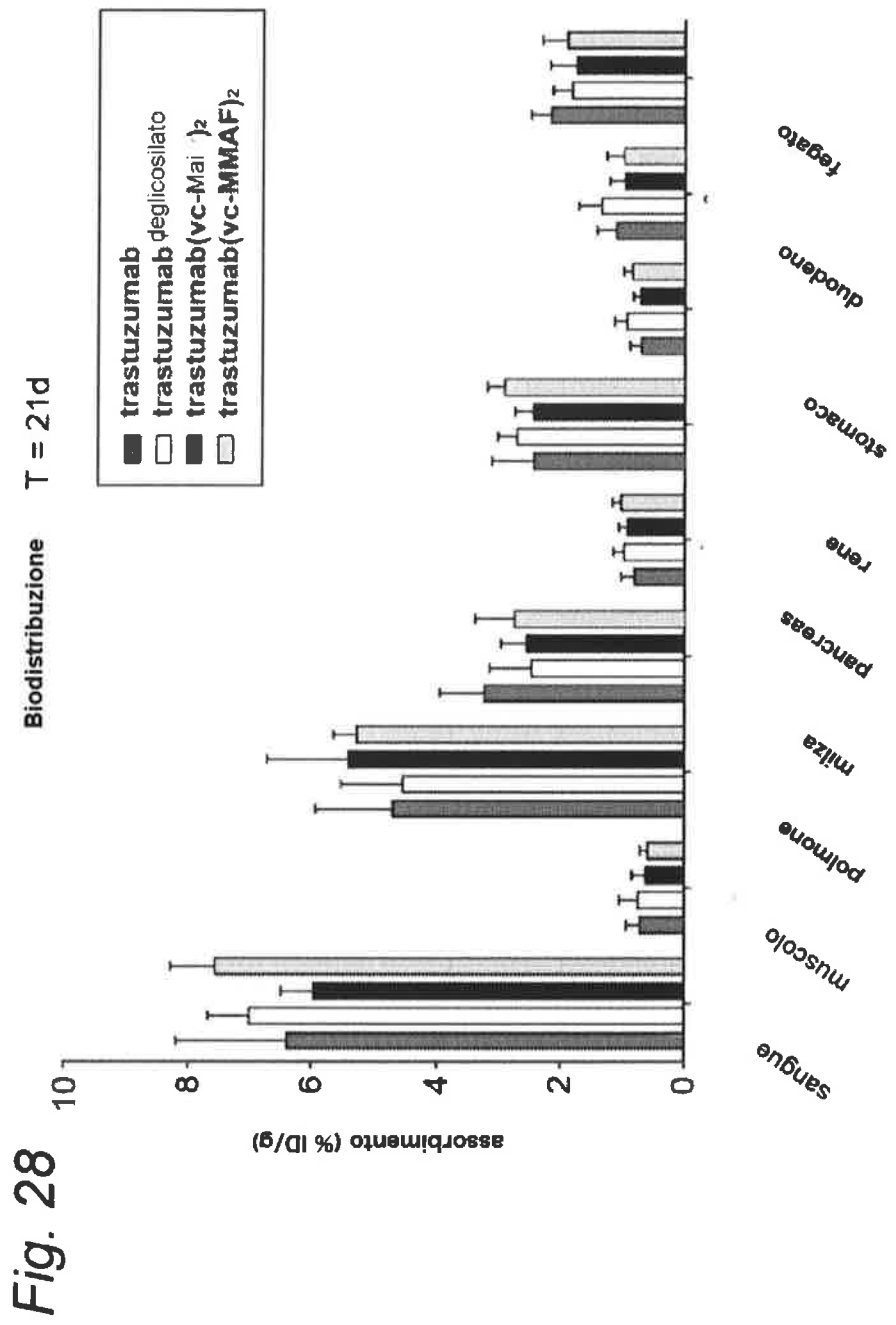


Fig. 26







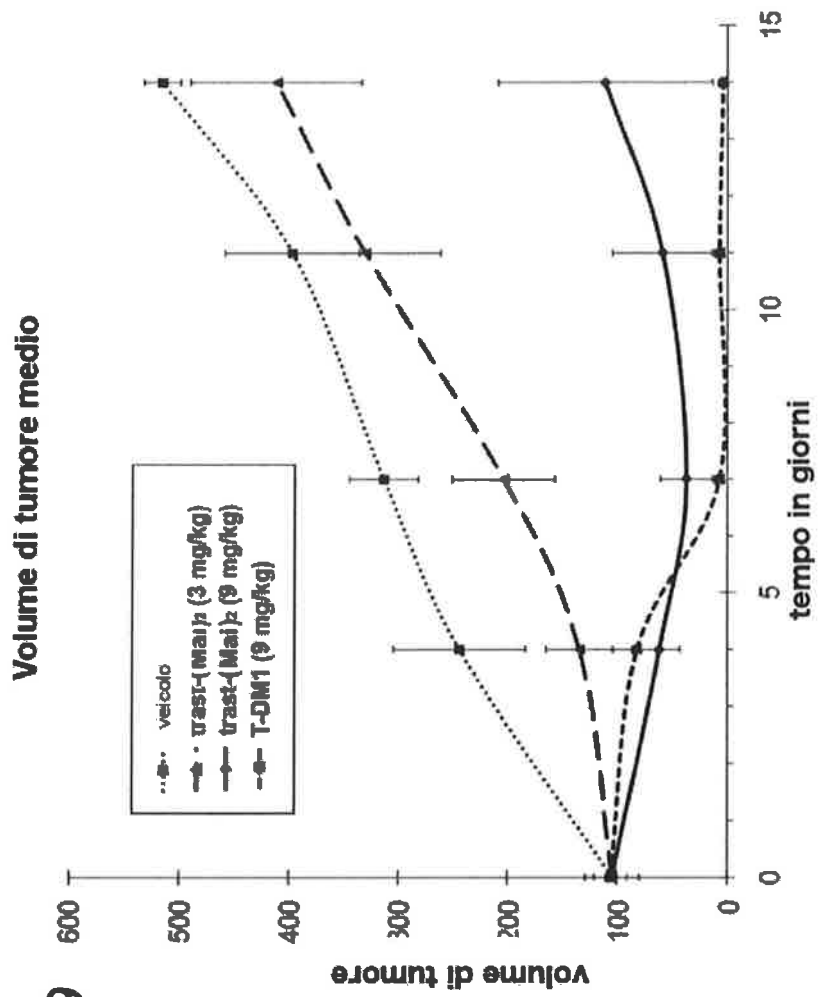


Fig. 29

Fig. 30

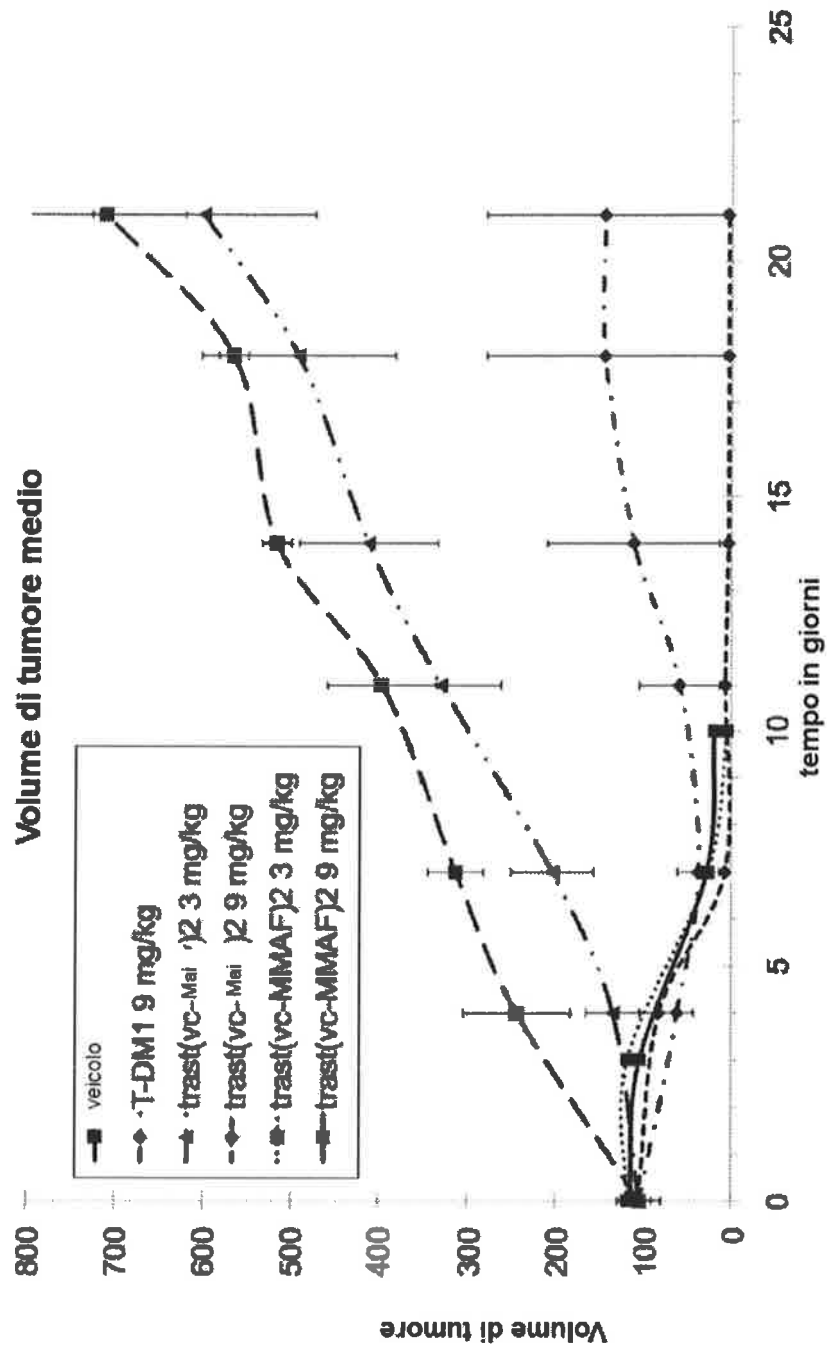


Fig. 31

