

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 575**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2017 PCT/EP2017/053157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2017 E 17705364 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3458100**

54 Título: **Reducción selectiva de anticuerpos con modificación de cisteínas**

30 Prioridad:

12.02.2016 EP 16155481

23.12.2016 EP 16206761

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

13.04.2021

73 Titular/es:

BYONDIS B.V. (100.0%)

Microweg 22

6545 CM Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

**COUMANS, RUDY GERARDUS ELISABETH y
SPIJKER, HENRI JOHANNES**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 818 575 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reducción selectiva de anticuerpos con modificación de cisteínas

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a un proceso para la reducción selectiva de anticuerpos con modificación de cisteínas y a un proceso para la preparación de conjugados de anticuerpos, incluidos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] Los anticuerpos con modificación de cisteínas se usan cada vez más para la conjugación de una fracción terapéutica (por ejemplo, un fármaco o una toxina), un radiofármaco, un marcador fluorescente o un polímero hidrófilo. La introducción de un residuo de cisteína en una posición adecuada del anticuerpo permite el control del sitio de conjugación y los conjugados específicos de sitio obtenidos son más homogéneos que los conjugados obtenidos a través de una conjugación de tipo salvaje, es decir, una conjugación a través de cisteínas de disulfuros intercatenarios. Tal conjugación de tipo salvaje lleva a una mezcla heterogénea de conjugados, que es desventajoso especialmente en el caso de los ADC. Algunos constituyentes individuales de una mezcla de ADC
15 conjugados de tipo salvaje pueden tener un mal rendimiento *in vivo*. El rendimiento *in vivo* de los ADC en cuanto a eficacia, seguridad y estabilidad se puede mejorar si los fármacos conectores de los ADC se conjugan de manera específica de sitio a través de cisteínas modificadas según B.-Q. Shen et al., Nature Biotechnology, 2012, 30 (2), 184-189.

20 [0003] Los métodos para una conjugación farmacológica específica de sitio a anticuerpos son revisados exhaustivamente por C.R. Behrens et al., MAbs, 2014, 6(1), 1-8. El primer enfoque de conjugación específica de sitio fue desarrollado en Genentech introduciendo un residuo de cisteína modificado usando la mutagénesis dirigida al sitio en posiciones que muestran una alta reactividad de tiol, como se desarrolla en la WO2006/034488. Esta práctica común en la modificación de proteínas es más complicada en un anticuerpo debido a los varios residuos de cisteína nativos ya presentes. La introducción del residuo de cisteína extra en una posición inapropiada podría
25 dar como resultado, entre otras cosas, la formación inapropiada de enlaces disulfuro intercatenarios y, por lo tanto, un plegamiento inapropiado del anticuerpo.

[0004] La WO2015/177360 de Synthon Biopharmaceuticals divulga ventajas de conjugar fármacos conectores con residuos de cisteína modificados en posiciones específicas en las partes Fab y Fc de anticuerpos monoclonales.

30 [0005] Los residuos de cisteína modificados en posiciones adecuadas del anticuerpo mutado están protegidos normalmente por otros tioles, tales como cisteína o glutatión, para formar disulfuros. Estos residuos protegidos necesitan ser desprotegidos antes de que pueda ocurrir la unión del fármaco. Para conseguir esto, se usa el siguiente procedimiento de reducción convencional: primero, reducción completa de todos los enlaces disulfuro intercatenarios y cisteínas modificadas protegidas con hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o ditiotreitól (DTT) para obtener residuos de cisteína libre, seguida de una oxidación suave, usando típicamente ácido deshidroascórbico (DHAA), para reformar los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo. Bajo condiciones óptimas, se unirán (si una cisteína se modifica en la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo monoclonal (mAb)) dos fármacos por anticuerpo (es decir, la proporción de fármaco a anticuerpo, DAR, es 2). Sin embargo, este enfoque convencional tiene varias desventajas. La reducción completa seguida de una reoxidación suave de los enlaces disulfuro intercatenarios de tipo salvaje puede llevar a una reforma incorrecta de estos enlaces disulfuro,
35 dando como resultado la formación de medio cuerpo de un mAb (es decir, una cadena pesada y una cadena ligera en vez de dos de cada) y "disulfuros aleatorios", es decir, enlaces disulfuro entre cisteínas que no estaban emparejadas en el anticuerpo no reducido original, lo que genera residuos de cisteína libre adicionales disponibles para la conjugación, dando como resultado una mezcla de ADC heterogénea. Además, el DHAA es inestable en agua, lo que complica el proceso de reoxidación suave.

45 [0006] Para abordar este problema, Seattle Genetics desarrolló una estrategia de reducción selectiva usando agentes reductores suaves, tal como el aminoácido cisteína. Esos agentes reducen las cisteínas modificadas protegidas a una mayor velocidad que los enlaces disulfuro intercatenarios, como se describe en la WO2015/123265. Sin embargo, una cisteína libre puede auto-oxidarse a cistina, un glutatión libre puede oxidarse a disulfuro de glutatión y se pueden formar disulfuros mixtos. Todos estos disulfuros pueden reprotger las cisteínas modificadas, invirtiendo la reducción inicial. Este problema se resolvió eliminando continuamente la cistina formada,
50 por ejemplo, por filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana de ultrafiltración. Esta solución, sin embargo, es desventajosa, ya que requiere una modificación considerable del equipo estándar para la conjugación farmacológica. Además, se observó una cantidad significativa de reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios, incluso bajo las condiciones de reacción más óptimas.

[0007] Incluso para proteínas que no son anticuerpos, existen pocos ejemplos de procesos para la reducción selectiva de cisteínas modificadas protegidas. La WO2006/134174 de Novo Nordisk divulga un proceso donde se utiliza ácido trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfónico (TPPTS) para reducir selectivamente una cisteína modificada protegida en factor de coagulación VIIa, seguido de la PEGilación de la proteína. Los enlaces disulfuro nativos se dejan intactos solo en presencia de un gran exceso de un inhibidor de sitio activo. Sin embargo, los presentes inventores descubrieron que el TPPTS reduce los enlaces disulfuro intercatenarios de los anticuerpos monoclonales, concluyendo que no es un agente adecuado para la reducción selectiva de cisteínas modificadas en anticuerpos monoclonales.

[0008] Por lo tanto, hay una necesidad de nuevos métodos para reducir selectivamente anticuerpos con modificación de cisteínas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención proporciona un proceso para la reducción selectiva de un anticuerpo con modificación de cisteínas. Además, proporciona un proceso para la preparación de conjugados de anticuerpo, incluidos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

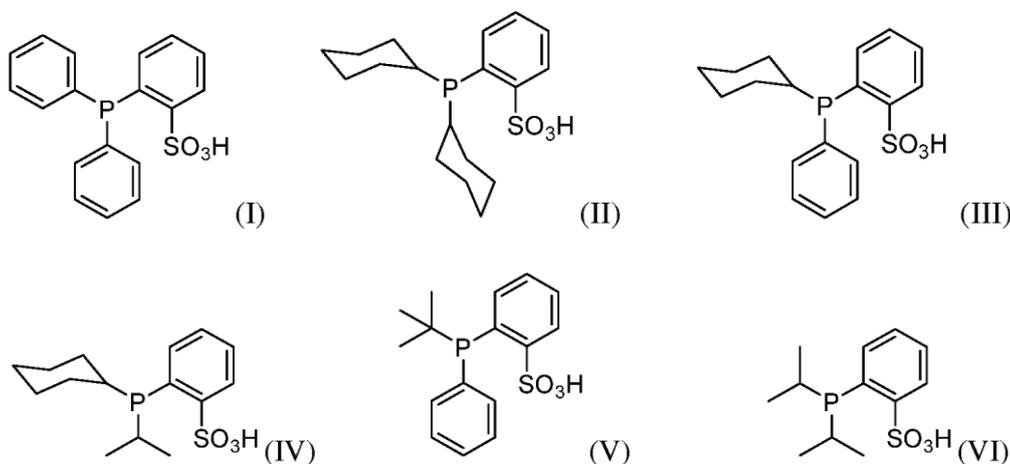
[0010]

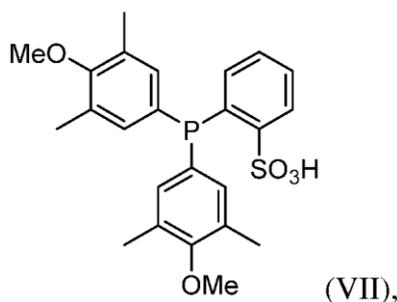
La figura 1 muestra una carrera de gel SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras de mezclas reactivas de un anticuerpo anti-PSMA con modificación de la cisteína 41 de la cadena pesada (HC41C) incubado con cuatro agentes reductores diferentes en los carriles 1, 2, 3 y 4 durante 8 días a temperatura ambiente. La numeración de las estructuras corresponde a los carriles.

La figura 2 muestra una carrera de gel SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras de mezclas reactivas de un ADC vc-seco-DUBA anti-PSMA HC41C después de la conjugación específica de sitio convencional usando el protocolo B en el carril 2 y después de la conjugación tras la reducción selectiva usando el protocolo A en el carril 3, con el anticuerpo anti-PSMA HC41C no conjugado en el carril 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0011] La presente invención se refiere a un proceso para la reducción selectiva de un anticuerpo con modificación de cisteínas que comprende hacer reaccionar un anticuerpo que comprende una o más cisteínas modificadas en las posiciones seleccionadas de entre 40, 41, 42 y 89 de la cadena pesada según el sistema de numeración de Kabat, 152, 153, 155 y 171 de la cadena pesada según el sistema de numeración Eu, 40 y 41 de la cadena ligera según el sistema de numeración de Kabat y 165 y 168 de la cadena ligera según el sistema de numeración Eu, con un compuesto según la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII):





o una sal derivada.

5 [0012] En el contexto de la presente invención, la numeración de Kabat se usa para indicar las posiciones de aminoácidos de cisteínas modificadas en las regiones variables de la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) y la numeración Eu se usa para indicar las posiciones en las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo. La expresión "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).

10 [0013] La expresión "numeración Eu" se refiere al índice Eu como en Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, publicación NIH n.º 91-3242, págs. 662, 680, 689 (1991).

15 [0014] En la descripción de la presente invención, la presencia de una cisteína modificada, por ejemplo, en la posición 41 de la cadena pesada de un anticuerpo, se puede abreviar como HC41C, en la posición 41 de la cadena ligera de un anticuerpo se puede abreviar como LC41C, etc.

20 [0015] El compuesto según la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII) actúa como un agente reductor en el proceso de la invención. El compuesto según la fórmula (I) es el ácido 2-(difenilfosfino)benzenosulfónico y el compuesto según la fórmula (II) es el ácido 2-(dodiclohexilfosfino)benzenosulfónico. Las fosfinas (I) y (II) están comercialmente disponibles como el ácido sulfónico o como la sal de sulfonato de sodio de varios proveedores, por ejemplo, Sigma-Aldrich. El compuesto según la fórmula (III), (IV), (V), (VI) o (VII) se puede preparar por procedimientos conocidos en la técnica (análogos a los procedimientos descritos, por ejemplo, en M. Bornand et al., *Organometallics*, 2007, 26 (14), 3585-3596 y T. Schultz et al., *Synthesis*, 2005, 6, 1005-1011). Los compuestos según las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) y (VII) se desprotonan fácilmente en solución acuosa y pueden formar sales de sulfonato correspondientes con los cationes presentes en la solución. Los cationes típicos son, por ejemplo, amonio, tetrametilamonio, trietanolamonio, imidazolio, sodio y potasio, es decir, cationes presentes en las soluciones tampón comunes.

30 [0016] Conforme a la presente invención se prefiere un proceso donde el anticuerpo con modificación de cisteínas se hace reaccionar con un compuesto según la fórmula (I), (II), (V), (VI) o (VII) o una sal derivada. También se prefiere conforme a la presente invención un proceso donde el anticuerpo con modificación de cisteínas se hace reaccionar con un compuesto según la fórmula (I), (II) o (III) o una sal derivada.

[0017] Más preferido conforme a la presente invención es un proceso donde el anticuerpo con modificación de cisteínas se hace reaccionar con un compuesto según la fórmula (I) o (II) o una sal derivada.

[0018] El más preferido conforme a la presente invención es un proceso donde el anticuerpo con modificación de cisteínas se hace reaccionar con un compuesto según la fórmula (I) o una sal derivada.

35 [0019] Los presentes inventores descubrieron entre otras cosas que, usando un agente reductor según la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII), las cisteínas modificadas protegidas en posiciones específicas en la cavidad Fab que está formada por los dominios CHI, VH, VL y CL del anticuerpo se reducen selectivamente, mientras que los enlaces disulfuro intercatenarios formados por los residuos de cisteína nativos se dejan intactos. Esto elimina completamente la formación de medio cuerpo de un mAb y de anticuerpos con disulfuros aleatorios.

40 [0020] Se prefiere un proceso según la presente invención donde el anticuerpo comprende una o más cisteínas modificadas en las posiciones seleccionadas de entre HC40, HC41, HC42, HC152, HC153, LC40, LC41 y LC165. Más preferido es un proceso según la presente invención donde el anticuerpo comprende una o más cisteínas

modificadas en las posiciones seleccionadas de entre HC41, HC42, LC40 y LC41. El más preferido es un proceso según la presente invención donde el anticuerpo comprende una cisteína en la posición 41 en la cadena pesada (es decir, HC41C).

5 [0021] Alternativamente, el proceso según la invención comprende hacer reaccionar un anticuerpo que comprende una o más cisteínas modificadas en las posiciones seleccionadas de entre 40, 41, 89, 152, 153 y 155 de la cadena pesada y 40, 41, 165 y 168 de la cadena ligera con un compuesto tal y como se ha definido anteriormente. Se prefiere un proceso según la presente invención donde el anticuerpo comprende una o más cisteínas modificadas en las posiciones seleccionadas de entre HC40, HC41, HC152, HC153, LC40, LC41 y LC165. Más preferido es un proceso según la presente invención donde el anticuerpo comprende una o más cisteínas modificadas en las
10 posiciones seleccionadas de entre HC41, LC40 y LC41.

[0022] Conforme a la presente invención, el anticuerpo con modificación de cisteínas se puede preparar usando técnicas moleculares de clonación convencionales o el/los dominio(s) de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo que lleva la(s) mutación/mutaciones de cisteína se puede(n) sintetizar como tales usando equipos y procedimientos de síntesis (de péptidos o ADN) conocidos. Típicamente, se utilizan procedimientos similares a los
15 descritos en la WO2015/177360.

[0023] Conforme a la presente invención, el término "anticuerpo" significa un anticuerpo completo o un fragmento del mismo donde están presentes enlaces disulfuro intercatenarios, por ejemplo, un fragmento F(ab')₂ o uno Fab.

[0024] El anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención puede ser de cualquiera de los isotipos siguientes: IgG, es decir, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgA secretora (sIgA), IgD e IgE. Preferiblemente, el anticuerpo es del isotipo IgG, más preferiblemente el anticuerpo es del isotipo IgG₁ o el isotipo IgG₂. Un anticuerpo IgG₁ que tiene cadenas ligeras κ es lo más preferido. Preferiblemente, el anticuerpo IgG lleva una fracción glicósido/carbohidrato nativa unida en el N297 de la cadena pesada del anticuerpo.
20

[0025] El anticuerpo que se va a usar en el proceso de la presente invención puede ser un anticuerpo monoespecífico (es decir, específico para un antígeno) o un anticuerpo biespecífico (es decir, específico para dos antígenos diferentes). En una forma de realización de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico (o un fragmento del mismo donde están presentes enlaces disulfuro intercatenarios).
25

[0026] Estos anticuerpos se pueden producir por recombinación, por síntesis o por otros métodos adecuados conocidos en la técnica.

[0027] Preferiblemente, el anticuerpo se une a una diana antigénica que se expresa en o sobre la membrana celular (por ejemplo, sobre la superficie celular) de una célula tumoral. Más preferiblemente, el anticuerpo es interiorizado por la célula después de unirse a la diana (antigénica).
30

[0028] Típicamente, un anticuerpo que podría usarse en el proceso de la presente invención es un anticuerpo monoespecífico contra una de las dianas seleccionadas del grupo que consiste en anexina AI, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA125, CA242, CCR2, CCR5, CD2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD56, CD70, CD74, CD79, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, Cripto, CTLA4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, anticuerpos Eph, tales como EphA2 o EphB3, ETBR, FAP, FcRL5, FGF, FGFR3, FOLR1, GCC, GPNMB, HER2, HMW-MAA, integrina, IGF1R, L6, carbohidratos tipo Lewis A, Lewis X, Lewis Y, LIV1, mesotelina, MUC1, MUC16, NaPi2b, nectina-4, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, 5T4 (o TPBG, glicoproteína trofoblástica), TF (factor tisular), TF-Ag, Tag72, TNF, TROP2, VEGF y VLA.
35

[0029] Ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen blinatumomab (CD19), epratuzumab (CD22), iratumumab y brentuximab (CD30), vadastuximab (CD33), tetulumab (CD37), isatuximab (CD38), bivatuzumab (CD44), lorvotuzumab (CD56), vorsetuzumab (CD70), milatuzumab (CD74), polatuzumab (CD79), rovalpituzumab (DLL3), futuximab (EGFR), oportuzumab (EPCAM), farletuzumab (FOLR1), glembatumumab (GPNMB), trastuzumab y pertuzumab (HER2), etaracizumab (integrina), anetumab (mesotelina), pankomab (MUC1), enfortumab (nectina-4), y H8, A1 y A3 (5T4).
40
45

[0030] En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD115, un anti-CD123, un anticuerpo anti-c-MET, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-FAP, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-Lewis Y, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-MUC16, un anticuerpo anti-PSMA, un anti-5T4, un anticuerpo anti-TF, un anticuerpo anti-TF-Ag, un anticuerpo anti-Tag72 y un anticuerpo anti-TROP2.
50

[0031] En otra forma de realización, el anticuerpo que se va a usar en el proceso de la presente invención es un anticuerpo biespecífico (o un fragmento bivalente del mismo) contra una combinación de dos dianas seleccionadas del grupo enumerado anteriormente.

5 [0032] El anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal (mAb) y puede ser un mAb quimérico, humanizado o humano. Más preferiblemente, conforme a la presente invención se usa un mAb humano o humanizado, aún más preferiblemente, un anticuerpo IgG humanizado o humano, más preferiblemente un mAb IgG₁ humanizado o humano. Preferiblemente, dicho anticuerpo tiene cadenas ligeras κ (kappa), es decir, un anticuerpo IgG₁-κ humanizado o humano.

10 [0033] En los anticuerpos humanizados, las CDR de unión a antígeno en las regiones variables derivan de anticuerpos de una especie no humana, comúnmente ratón, rata o conejo. Estas CDR no humanas se colocan dentro de una estructura humana (FR1, FR2, FR3 y FR4) de la región variable y se combinan con regiones constantes humanas. Como los anticuerpos humanos, estos anticuerpos humanizados se pueden numerar según los sistemas de numeración de Kabat y Eu.

15 [0034] Como un ejemplo representativo, el anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es el anticuerpo anti-PSMA con una cisteína modificada en la posición 41 de la cadena pesada (es decir, HC41C) que se describe en la WO2015/177360 como SYD1030 (la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5).

20 [0035] Como otro ejemplo representativo, el anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es el anticuerpo anti-5T4 que se describe en la WO2015/177360 como H8-HC41C (la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11).

25 [0036] El proceso de la presente invención se realiza bajo condiciones suaves, es decir, condiciones bajo las que el anticuerpo es estable. La temperatura de reacción está típicamente en el rango de 0°C a 40°C, el pH está típicamente en el rango de 4 a 8. Se prefiere un pH en el rango de 4 a 7. Más preferido es un pH en el rango de 5 a 6.

30 [0037] Típicamente, la reacción de reducción selectiva conforme a la presente invención se realiza en una solución acuosa tamponada. Los anticuerpos con modificación de cisteínas que se producen en células huésped (de mamífero) y que se aíslan y purifican usando equipos y procedimientos convencionales pueden necesitar un cambio de tampón para obtener las condiciones óptimas para el proceso de reducción selectiva conforme a la presente invención. Los tampones adecuados incluyen una solución salina tamponada con fosfato (PBS), una solución acuosa tamponada con citrato, con histidina, con acetato o con succinato. Sales adicionales y otros solutos (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, EDTA) pueden estar presentes en la solución acuosa tamponada. Un tampón preferido es un tampón de histidina. Las condiciones de reacción descritas anteriormente afectan principalmente a la velocidad y al grado de finalización del proceso de reducción selectiva y/o la estabilidad del anticuerpo.

35 [0038] En una forma de realización de la presente invención, el proceso comprende hacer reaccionar un anticuerpo con modificación de cisteínas con un compuesto según la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII), donde el compuesto está presente en una cantidad de al menos un equivalente molar por cantidad molar de cisteína modificada. Esto significa que, para reducir selectivamente un anticuerpo que tiene una cisteína modificada en la cadena pesada o ligera, es decir, dos cisteínas modificadas están presentes en el anticuerpo, se usan al menos dos moles de agente reductor por mol de anticuerpo. Se prefiere un proceso donde se usa una cantidad de 2 a 16 equivalentes molares por (cantidad molar de) cisteína modificada. Si se usa menos de un equivalente molar por cantidad molar de cisteína modificada, no se consigue la reducción completa de todas las cisteínas modificadas. La proporción molar de agente reductor por cisteína modificada afecta a la velocidad de reducción (desprotección) de las cisteínas modificadas, pero no tiene ninguna influencia en la selectividad de la reducción. El agente reductor en exceso sin reaccionar se elimina antes de convertir el anticuerpo desprotegido en el conjugado de un anticuerpo, típicamente por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), filtración de flujo tangencial (TFF) o filtración de carbono activo. La posibilidad de eliminar el agente reductor en exceso mediante un paso rápido de filtración de carbono activo es ventajosa, ya que la UF/DF y la TFF son bastante laboriosas.

40
45

50 [0039] La presente invención se refiere además a un proceso para la preparación del conjugado de un anticuerpo, que comprende el proceso para la reducción selectiva de un anticuerpo con modificación de cisteínas como se ha descrito anteriormente. Típicamente, el proceso para la preparación del conjugado de un anticuerpo conforme a la invención comprende además la conjugación con una fracción terapéutica (por ejemplo, una toxina o un fármaco), un radiofármaco (por ejemplo, pendetido de indio), un marcador fluorescente (por ejemplo, fluoresceína) o un polímero hidrófilo (por ejemplo, polietilenglicol, PEG) a través de un conector escindible o no escindible. Los

métodos para la conjugación a través de cisteínas modificadas o de tipo salvaje reducidas conocidas en la técnica son adecuados para usar en el proceso para la preparación del conjugado de un anticuerpo según la invención.

5 [0040] Como el proceso para la reducción selectiva según la presente invención no rompe los enlaces disulfuro intercatenarios formados por residuos de cisteína nativos, no ocurre ninguna conjugación de tipo salvaje, no se forma ningún conjugado a través de un medio cuerpo de un mAb (véase la figura 2) y el proceso da como resultado una menor cantidad de especies de alto peso molecular (HMW), en comparación con el procedimiento de conjugación específica de sitio convencional (véase la tabla 2). Por tanto, el proceso de la presente invención permite una conjugación selectiva a través de cisteínas modificadas desprotegidas, sin conjugación con cisteínas de tipo salvaje desprotegidas, lo que conduce a un producto de conjugado de anticuerpo más homogéneo. El proceso de conjugación de anticuerpos se describe en la presente a continuación con más detalle para conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Ventajosamente, el proceso según la presente invención es un procedimiento en dos pasos: la reducción selectiva de un anticuerpo con modificación de cisteínas seguida de la conjugación del anticuerpo. El procedimiento de conjugación convencional para los ADC, sin embargo, comprende tres pasos, es decir, (i) la reducción completa de un anticuerpo con modificación de cisteínas, (ii) la reoxidación parcial de enlaces disulfuro intercatenarios y (iii) la conjugación del anticuerpo. Se describen ejemplos del procedimiento de conjugación específica de sitio convencional en los ejemplos 11 y 12 de la WO2006/034488, que describen la conjugación específica de sitio de un fármaco conector que comprende un maitansinoide (DM1) con un anticuerpo, o el procedimiento descrito por Doronina et al. *Bioconjugate Chem.*, 2006, 17, 114-124, que describe la conjugación de un anticuerpo con mc-MMAF.

20 [0041] Preferiblemente, el proceso para la preparación del conjugado de un anticuerpo según la presente invención comprende además conjugar una fracción terapéutica (por ejemplo, una toxina o un fármaco) a través de un conector escindible o no escindible para formar un conjugado anticuerpo-fármaco o ADC.

25 [0042] El conector que se va a usar conforme a la presente invención debería comprender un grupo funcional que pueda reaccionar con el grupo tiol de una cisteína modificada desprotegida, por ejemplo, un grupo maleimida o uno haloacetilo. Preferiblemente, el conector usado es un conector escindible. Se conocen en la técnica conectores escindibles adecuados y comprenden, por ejemplo, una fracción valina-citrulina (vc) o una valina-alanina (va).

30 [0043] El proceso de conjugación de anticuerpos conforme a la presente invención se puede realizar en una solución acuosa tamponada, por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato (PBS), una solución acuosa tamponada con citrato, con histidina o con succinato, a un pH y una temperatura a los cuales el anticuerpo, la fracción que se va a conjugar (por ejemplo, una toxina conectora, un fármaco conector o un marcador fluorescente conector) y el conjugado de anticuerpo resultante sean estables. Típicamente, el pH está en el rango de 5 a 8 y la temperatura está en el rango de 0°C a 40°C. Sales adicionales y otros solutos (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, EDTA) pueden estar presentes en la solución acuosa tamponada. En el caso de que la fracción terapéutica que se va a conjugar con el anticuerpo sea poco hidrosoluble, por ejemplo, en el caso de un fármaco conector hidrofóbico, la fracción terapéutica puede ser disuelta en un solvente orgánico miscible en agua. Los solventes adecuados incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), propilenglicol y etilenglicol.

[0044] Los conjugados de anticuerpo resultantes se pueden purificar usando métodos estándar conocidos por la persona experta en la materia, por ejemplo, la filtración de carbono activo para eliminar el fármaco conector en exceso y la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para eliminar cualquier anticuerpo sin reaccionar.

40 [0045] Los conjugados de anticuerpo preparados según el proceso de la presente invención se pueden analizar usando métodos analíticos conocidos en la técnica, por ejemplo, la HPLC, la HPLC de fase hidrofóbica protegida (SHPC), la HIC y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

[0046] Conforme a la presente invención se prefiere un proceso para la preparación de un ADC donde la fracción terapéutica es una toxina o un fármaco.

45 [0047] Más preferido es un proceso para la preparación de un ADC donde la fracción terapéutica es un inhibidor de tubulina (por ejemplo, un derivado de maitansinoide, auristatina o tubulísina), una proteína inactivadora de ribosomas (por ejemplo, un derivado de saporina), un agente de unión al surco menor del ADN (por ejemplo, un derivado de duocarmicina o de pirrolobenzodiazepina (PBD)), un agente que daña el ADN (por ejemplo, un derivado de PBD), un agente alquilante del ADN (por ejemplo, un derivado de duocarmicina), un agente intercalable en el ADN (por ejemplo, un derivado de caliqueamicina), un agente de reticulación del ADN (por ejemplo, un derivado dimérico de 1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol (CBI)), un inhibidor de ARN-polimerasa (por ejemplo, un derivado de amanitina), un agente de escisión del ADN (por ejemplo, un derivado de caliqueamicina) o un agente que interrumpe la síntesis de proteínas o la función de proteínas celulares esenciales (por ejemplo, un inhibidor de la topoisomerasa I o II (por ejemplo, un derivado de camptotecina), un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de

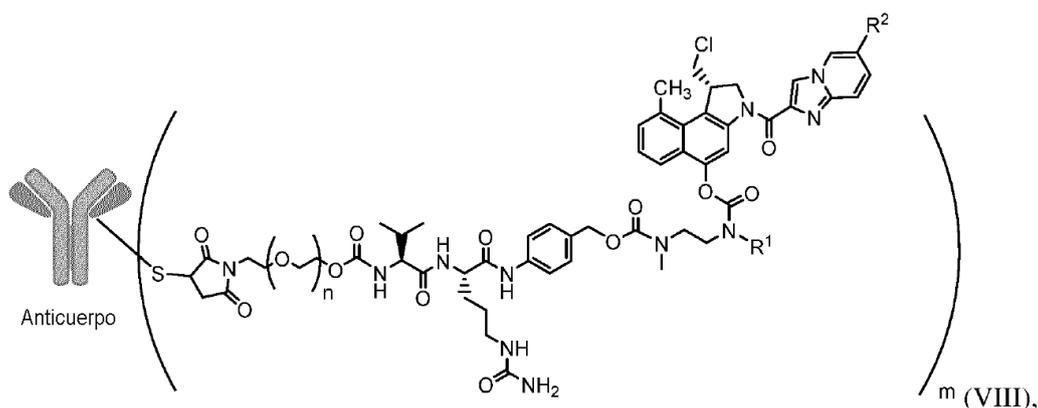
histonas deacetilasas, un inhibidor de la exportación nuclear, un inhibidor de quinasas o un inhibidor de la proteína de choque térmico 90).

5 [0048] Se prefiere aún más un proceso para la preparación de un ADC donde la fracción terapéutica es un derivado de una duocarmicina, un dímero de CBI, una caliqueamicina, una PBD, un dímero de PBD, un maitansinoide, una tubulisina, una camptotecina, una amanitina o una auristatina. Más preferiblemente, la fracción terapéutica es un derivado de duocarmicina.

[0049] Los ejemplos de fracciones terapéuticas adecuadas incluyen la duocarmicina *seco*-DUBA, la caliqueamicina N-acetil gamma caliqueamicina dimetil hidrazida (CalichDMH), el dímero de PBD SGD-1882, los maitansinoides DM1 y DM4 y las auristatinas monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF).

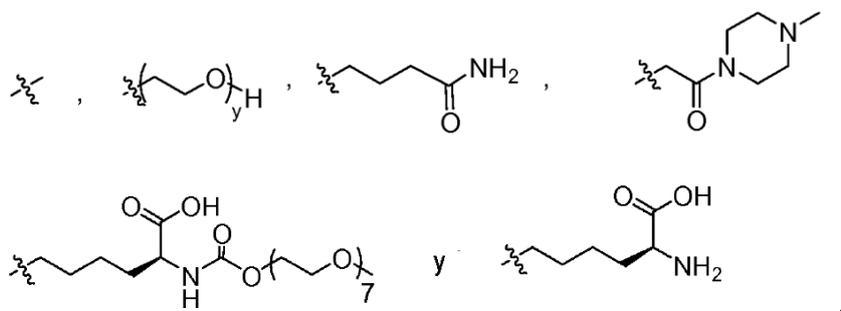
10 [0050] Los ejemplos de fármacos conectores (LD) adecuados incluyen *vc-seco*-DUBA (SYD980), mertansina, emtansina, ravtansina, *mc-vc*-PAB-MMAE (también abreviada como *mc-vc*-MMAE o *vc*-MMAE), *mc*-MMAF y *mc-vc*-MMAF. Estas abreviaturas son bien conocidas por la persona experta en la materia (véase también la WO2015/177360). El fármaco conector *vc-seco*-DUBA se describe en la WO2011/133039 como el compuesto 18b en la pg. 210, 11. 21- 27.

15 [0051] En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un ADC según la fórmula (VIII),

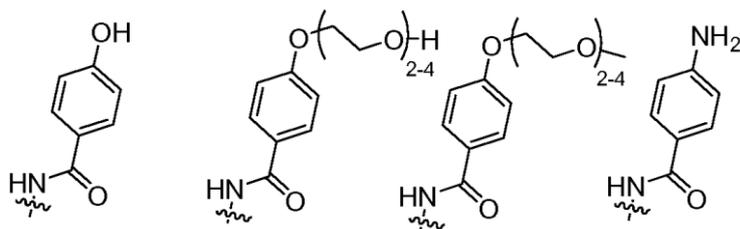


donde

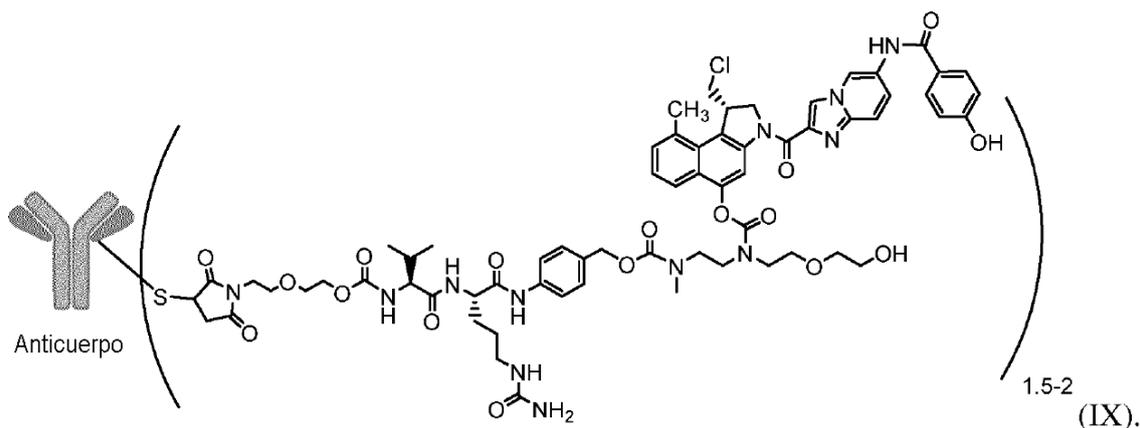
20 n es 0-3, preferiblemente 0-1,
m representa una DAR media de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4,
R¹ se selecciona de



25 y es 1-16 y
R² se selecciona de



[0052] Se prefiere un proceso según la presente invención para la preparación de un ADC según la fórmula (IX)



EJEMPLOS

5 Materiales y métodos

[0053] Se obtuvieron anticuerpos con modificación de cisteínas usando los materiales y los procedimientos descritos en la WO2015/177360. Los reactivos y los tampones se procuraron de proveedores comerciales. Los compuestos según la fórmula (I), es decir, el ácido 2-(difenílfosfino)benzenosulfónico, y (II), es decir, el ácido 2-(díciclohexilfosfino)benzenosulfónico, el ácido 3-(difenílfosfino)benzenosulfónico, el ácido 4-(difenílfosfino)benzenosulfónico y el ácido trifenílfosfino-3,3',3''-trisulfónico se compraron de Sigma-Aldrich. Los compuestos según la fórmula (III), (IV), (V), (VI) y (VII) se prepararon por litiación de ácido benzenosulfónico, seguido de la reacción del ácido benzenosulfónico litiado con la dialquil, diaril o alquil/aril (cloro)fosfina apropiada usando procedimientos análogos a los procedimientos de la literatura, por ejemplo, M. Bornand et al., Organometallics, 2007, 26 (14), 3585-3596 y T. Schultz et al., Synthesis, 2005, 6, 1005-1011. La reducción de las cisteínas modificadas y la conjugación de fármaco conector (vc-seco-DUBA) se realizó según o el protocolo A o el protocolo B como se describe a continuación. El fármaco conector vc-seco-DUBA se sintetizó según los procedimientos descritos en la WO2011/133039. Los ADC resultantes se analizaron usando la SDS-PAGE, la HIC, la SHPC y la SEC. Los resultados se describen en las tablas 1 y 2 (y en las figuras 1 y 2).

[0054] *SDS-PAGE* - Para la electroforesis en gel SDS-PAGE no reductora, se diluyó una muestra a 0,2 mg/ml usando agua purificada (Milli-Q), seguido de una dilución 1 a 1 con tampón de electroforesis (Tris-HCl 65,8 mM, pH 6,8, glicerol al 26,3% (p/v), SDS al 2,1%, azul de bromofenol al 0,01%, tampón de muestra Laemmli 2x (Bio-Rad, n.º cat. 161-0737)). La mezcla se incubó a 70°C durante 10 minutos. Se cargó 1 µg (10 µl) por ranura sobre un gel preformado al 4-20% (Criterion TGX Stain free Bio-Rad, n.º cat. 567-8094), se cargaron adicionalmente una o más ranuras con un marcador estándar no teñido (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Strep-tagged recombinant, Bio-Rad n.º cat. 161-0363). La electroforesis en gel se realizó a 300 V durante ± 20-25 minutos en tampón Tris/glicina/SDS (Tris 25 mM, glicina 1,92 M, SDS al 0,1%, pH 8,3, Bio-Rad n.º cat. 161-0772). Los geles se visualizaron en un sistema de imagen de geles (Gel Doc® Ez System Bio-Rad cat. n.º 1708270).

[0055] *HIC* - Para la HIC analítica, se inyectaron 5-10 µl de muestra (1 mg/ml) en una columna TSKgel Butyl-NPR (4,6 mm ID x 3,5 cm L, Tosoh Bioscience, n.º cat. 14947). El método de elución consistió en un gradiente lineal del 100% de tampón A (fosfato sódico 25 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 6,95) al 100% de tampón B (fosfato sódico 25 mM, pH 6,95, isopropanol al 20%) a 0,4 ml/min a lo largo de 20 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Se usó un sistema de UPLC Waters Acquity H-Class equipado con un detector PDA y el *software* Empower. La absorbancia se midió a 214 nm para cuantificar la DAR media.

5 [0056] *SHPC* - Se preparaon las muestras mezclando 70 µl de solución de ADC con 30 µl de DMA. Se inyectaron 50 µl de las muestras en una columna de fase hidrofóbica protegida (SUPELCO SIL LC-HISEP 5 µm, 4,6 mm ID x 15 cm L, Supelco (Sigma-Aldrich), n.º cat. 58935) montada en un sistema de cromatografía en fase líquida de rendimiento ultra alto (UPLC) (sistema de UPLC Waters Acquity H-Class equipado con un detector PDA y el *software* Empower). El método de elución consistió en un gradiente lineal de un 90% de tampón A (acetato amónico 100 mM, pH 4,0) y un 10% de tampón B (acetonitrilo) a un 32% de tampón A y un 68% de tampón B a 1,0 ml/min a lo largo de 10 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 45°C. La absorbancia se midió a 325 nm para cuantificar la cantidad de fármaco conector (LD) libre.

10 [0057] *SEC* - Para la SEC analítica, se inyectaron 5 µl de muestra (1 mg/ml) en una columna TSKgel G3000SWXL (5 µm, 7,8 mm ID x 30 cm L, Tosoh Bioscience, n.º cat. 08541) equipado con una precolumna TSKgel SWXL (7 µm, 6,0 mm ID x 4,0 cm L, Tosoh Bioscience, n.º cat. 08543). El método de elución consistió en la elución con el 100% de fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5 a 0,6 ml/min durante 30 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Se usó un sistema de UPLC Waters Acquity H-Class equipado con un detector PDA y el *software* Empower. La absorbancia se midió a 214 nm para cuantificar la cantidad de especies de HMW.

15 **A. Protocolo general de reducción selectiva/conjugación específica de sitio según la invención**

Reducción

20 [0058] Una solución de anticuerpo con modificación de cisteínas (10-40 mg/ml en histidina 15 mM, sacarosa 50 mM, polisorbato-20 al 0,01%, pH 5) se diluyó con histidina 100 mM, pH 5 (±1300 µl) y EDTA (25 mM en agua, 5% v/v). Se añadió ácido 2-(difenilfosfino)benzenosulfónico (DPPBS, compuesto (I)) (10 mM en agua, 2-32 equivalentes) y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 16-24 h. El DPPBS en exceso se eliminó mediante un concentrador por centrifugación (filtro Vivaspin, corte de 30 kDa, PES) usando histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6.

[0059] Condiciones similares se usaron para la reducción usando los compuestos (II)-(VII).

Conjugación

25 [0060] El pH de la solución de anticuerpo resultante se mantuvo a 6 o se elevó a ~7,4 usando Tris (1 M en agua, pH 8), después de lo cual se añadió DMA seguido de una solución de fármaco conector (10 mM en DMA). La concentración final de DMA fue 5-10%. La mezcla resultante se incubó durante toda la noche a RT en ausencia de luz en el caso del pH 6 o durante 2-3 h en el caso del pH 7,4. Para eliminar el exceso de fármaco conector, se añadió carbón activo y la mezcla se incubó a RT durante al menos 0,5 h. El carbón se eliminó usando un filtro PES de 0,2 µm y el ADC resultante se formuló en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6, usando un concentrador por centrifugación Vivaspin (corte de 30 kDa, PES).

B. Protocolo general de conjugación específica de sitio convencional

Reducción

35 [0061] Se diluyó una solución de anticuerpo con modificación de cisteínas (250 µl, 48 mg/ml en histidina 15 mM, sacarosa 50 mM, polisorbato-20 al 0,01%, pH 6) con histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6 (750 µl) y EDTA (25 mM en agua, 4% v/v). El pH se ajustó a ~7,4 usando Tris-HCl (1 M en agua, pH 8), después de lo cual se añadió TCEP (10 mM en agua, 20 equivalentes) y la mezcla resultante se incubó a RT durante 1-3 h. El TCEP en exceso se eliminó mediante un concentrador por centrifugación Vivaspin (corte de 30 kDa, PES) usando histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6.

40 *Conjugación*

45 [0062] El pH de la solución de anticuerpo resultante se elevó a ~7,4 usando Tris-HCl (1 M en agua, pH 8), después de lo cual se añadió ácido deshidroascórbico (10 mM en agua, 20 equivalentes) y la mezcla resultante se incubó a RT durante 2 h. Se añadió DMA seguido de una solución de fármaco conector (10 mM en DMA). La concentración final de DMA fue 5-10%. La mezcla resultante se incubó a RT en ausencia de luz durante 1-2 h. Para eliminar el exceso de fármaco conector, se añadió carbón activo y la mezcla se incubó a RT durante al menos 0,5 h. El carbón se eliminó usando un filtro PES de 0,2 µm y el ADC resultante se formuló en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6, usando un concentrador por centrifugación Vivaspin (corte de 30 kDa, PES).

Resultados

[0063] La figura 1 muestra una carrera de gel SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (como se ha descrito anteriormente) de mezclas reactivas de un anticuerpo anti-PSMA con modificación de la cisteína 41 de la cadena pesada (HC41C) incubado con cuatro agentes reductores diferentes en los carriles 1, 2, 3 y 4 durante 8 días a temperatura ambiente. La numeración de las estructuras corresponde a los carriles. La estructura 2 es un compuesto según la fórmula (I). La banda correspondiente al peso molecular (MW) de un anticuerpo intacto está marcada como LHHL, las bandas correspondientes al MW de la cadena pesada están marcadas como H, aquellas correspondientes al MW de la cadena ligera están marcadas como L. La incubación con los compuestos 1, 3 y 4 da como resultado la reducción de los disulfuros intercatenarios, indicada por la ausencia de anticuerpo intacto y la presencia de bandas de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Sin embargo, el compuesto 2 no reduce los disulfuros intercatenarios, como indica la ausencia de bandas de cadenas pesadas y cadenas ligeras y la presencia de anticuerpo intacto.

[0064] La figura 2 muestra una carrera de gel SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras de mezclas reactivas de un ADC vc-seco-DUBA anti-PSMA HC41C después de la conjugación específica de sitio convencional usando el protocolo B en el carril 2 y después de la conjugación tras la reducción selectiva usando el protocolo A en el carril 3 (usando el DPPBS, compuesto (I)), con el anticuerpo anti-PSMA HC41C no conjugado en el carril 1, que sirve como control de la ausencia de medio cuerpo de un mAAb. La banda correspondiente al

[0065] MW de 75kDa indica la presencia de medio cuerpo de un mAAb y está presente en el carril 2. Por tanto, el protocolo B da como resultado la formación de medio cuerpo de un mAAb. Sin embargo, la ausencia de esta banda en el carril 3 indica que no se forma medio cuerpo durante el proceso selectivo de reducción/conjugación según el protocolo A.

[0066] Usando los procedimientos anteriormente descritos, se analizaron los productos ADC obtenidos usando los protocolos A y B. Los resultados se resumen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: resultados de la reducción/conjugación de varios anticuerpos con modificación de cisteínas usando el compuesto (I)¹

ADC vc-seco-DUBA	Mutación de Cys		Compuesto (I)
	HC	LC	
Anti-PSMA	41C	wt	++
Anti-PSMA	152C	wt	++
Anti-PSMA	153C	wt	++
Anti-PSMA	wt	40C	++
Anti-PSMA	wt	41C	++
Anti-PSMA	wt	165C	++
H8	40C	wt	+/-
H8	41C	wt	++
Trastuzumab	41C	wt	++

++ reacción selectiva y rápida, +/- reacción selectiva pero lenta, wt de tipo salvaje
¹ Los compuestos (I), (II), (V), (VI) y (VII) se evaluaron usando el anticuerpo anti-PSMA HC41C y mostraron una reducción selectiva lenta.

[0067] Los compuestos (I), (II), (V), (VI) y (VII) no redujeron los disulfuros intercatenarios; los compuestos solo redujeron la cisteína modificada. El compuesto (I) reduce la cisteína modificada con una mayor velocidad que los compuestos (II), (V), (VI) y (VII). El H8-HC40C se reduce con una velocidad lenta.

Tabla 2: comparación entre los protocolos de reducción/conjugación A y B

El protocolo A es el protocolo general para la reducción selectiva/conjugación específica de sitio según la invención, mientras que el protocolo B es el protocolo general para la reducción convencional/conjugación específica de sitio			
ADC vc-seco-DUBA anti-PSMA HC41C			
Protocolo		A	B
% monómero	SEC	99,0	97,9

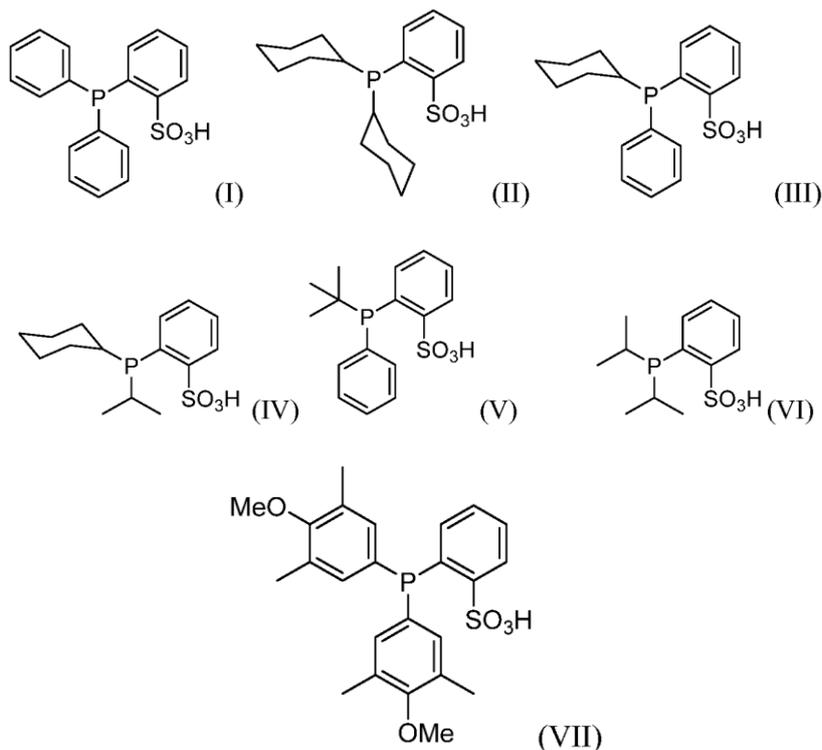
ES 2 818 575 T3

% HMW	SEC	1,0	2,1
% medio cuerpo de un mAb	SDS-PAGE	0	6
DAR media	HIC	1,80	1,80
% DAR0	HIC	1,6	1,5
% LD libre	SHPC	<LOD	<LOD
DR0 = anticuerpo desnudo			

[0068] El producto ADC obtenido con el protocolo A contiene una mayor cantidad de monómero y una cantidad inferior de agregados de alto peso molecular y medio cuerpo de un mAb que el producto ADC obtenido con el protocolo B. Por tanto, el protocolo A da como resultado un producto ADC más homogéneo que el protocolo B.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la reducción selectiva de un anticuerpo con modificación de cisteínas que comprende hacer reaccionar un anticuerpo que comprende una o más cisteínas modificadas en las posiciones seleccionadas de entre 40, 41, 42 y 89 de la cadena pesada según el sistema de numeración de Kabat, 152, 153, 155 y 171 de la cadena pesada según el sistema de numeración Eu, 40 y 41 de la cadena ligera según el sistema de numeración de Kabat y 165 y 168 de la cadena ligera según el sistema de numeración Eu, con un compuesto según la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII)



10

o una sal derivada.

2. Proceso según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una o más cisteínas modificadas en las posiciones seleccionadas de entre 40, 41, 42, 152 y 153 de la cadena pesada y 40, 41 y 165 de la cadena ligera.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo comprende una o más cisteínas modificadas en las posiciones seleccionadas de entre 41 y 42 de la cadena pesada y 40 y 41 de la cadena ligera.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo comprende una cisteína modificada en la posición 41 de la cadena pesada.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto según la fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) o (VII) está presente en una cantidad de al menos un equivalente molar por cantidad molar de cisteína modificada.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto es un compuesto según la fórmula (I) o una sal derivada.

20

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el anticuerpo es un anticuerpo mono-específico contra una de las dianas seleccionadas del grupo que consiste en anexina A1, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA125, CA242, CCR2, CCR5, CD2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD56, CD70, CD74, CD79, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, Cripto, CTLA4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, anticuerpos Eph, tales como EphA2 o EphB3, ETBR, FAP, FcRL5, FGF, FGFR3, FOLR1, GCC, GPNMB, HER2, HMW-MAA, integrina, IGF1R, L6, carbohidratos tipo Lewis A, Lewis X, Lewis Y, LIV1, mesotelina, MUC1, MUC16, NaPi2b, nectina-4, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, 5T4 (o TPBG,

25

glicoproteína trofoblástica), TF (factor tisular), TF-Ag, Tag72, TNF, TROP2, VEGF y VLA; o un anticuerpo biespecífico contra una combinación de dos dianas seleccionadas de dicho grupo.

8. Proceso según la reivindicación 7, donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD115, un anticuerpo anti-CD123, un anticuerpo anti-c-MET, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-FAP, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-Lewis Y, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-MUC16, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-5T4, un anticuerpo anti-TF, un anticuerpo anti-TF-Ag, un anticuerpo anti-Tag72 y un anticuerpo anti-TROP2.

9. Proceso para la preparación de un conjugado de anticuerpo que comprende el proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

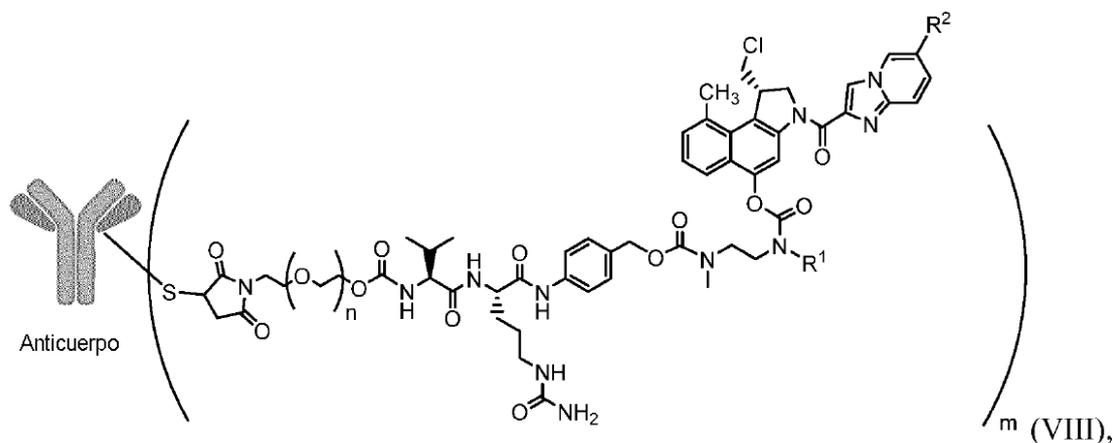
10. Proceso según la reivindicación 9 que comprende además conjugar una fracción terapéutica, un radiofármaco, un marcador fluorescente o un polímero hidrófilo a través de un conector escindible o no escindible.

11. Proceso según la reivindicación 10, donde la fracción terapéutica es un inhibidor de tubulina, una proteína inactivadora de ribosomas, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente que daña el ADN, un agente alquilante del ADN, un agente intercalable en el ADN, un agente de reticulación del ADN, un inhibidor de ARN-polimerasa, un agente de escisión del ADN o un agente que interrumpe la síntesis de proteínas o la función de proteínas celulares esenciales.

12. Proceso según la reivindicación 10 u 11, donde la fracción terapéutica es un derivado de una duocarmicina, un dímero de CBI, una caliqueamicina, un PBD, un dímero de PBD, un maitansinoide, una tubulisina, una camptotecina, una amanitina o una auristatina.

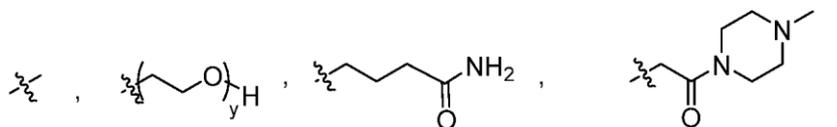
13. Proceso según la reivindicación 12, donde la fracción terapéutica es un derivado de duocarmicina.

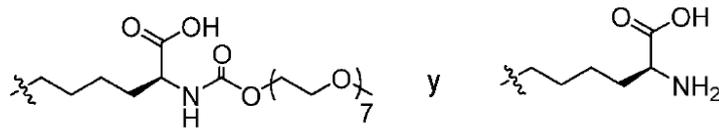
14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde el conjugado de anticuerpo es un conjugado anticuerpo-fármaco según la fórmula (VIII),



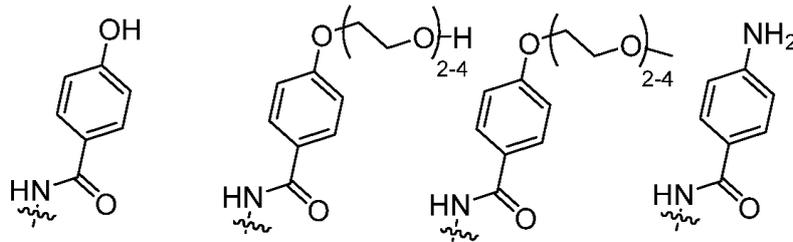
donde

25 n es 0-3, preferiblemente 0-1,
m representa una DAR media de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4,
R¹ se selecciona de





y es 1-16 y
R² se selecciona de



5 15. Proceso según la reivindicación 14, donde el conjugado anticuerpo-fármaco es según la fórmula (IX)

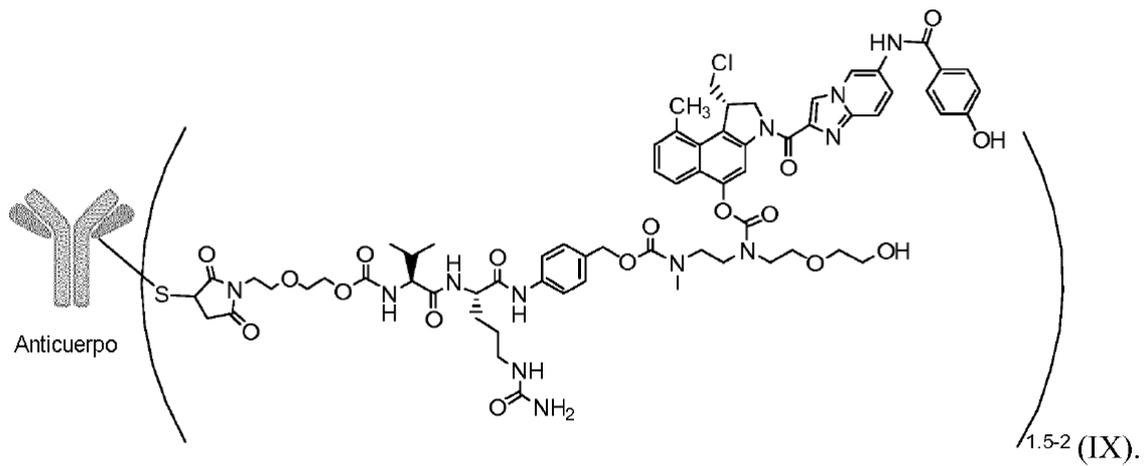


Figura 1

