CONJUGADOS DE ANTICUERPO MODULADOR DE EMPALME–FÁRMACO Y MÉTODOS DE USO

[0001] La presente divulgación reivindica el beneficio de prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nro. 62/679.672, presentada el 1 de junio de 2018; la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nro. 62/679.631, presentada el 1 de junio de 2018; y la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nro. 62/779.324, presentada el 13 de diciembre de 2018. Todas las solicitudes mencionadas anteriormente se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[0002] La presente divulgación se refiere a conjugados de anticuerpo–fármaco (ADC) que comprenden un modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un blanco de antígeno de oncología humana. La divulgación se refiere además a métodos y composiciones útiles en el tratamiento o diagnóstico de cánceres que expresan un antígeno blanco y/o son susceptibles de tratamiento mediante la interrupción del empalme del ARN, así como a métodos para elaborar esas composiciones.

[0003] La mayoría de los genes codificantes de proteínas en el genoma humano están compuestos de múltiples exones (regiones codificantes) que están separados por intrones (regiones no codificantes). La expresión génica da como resultado un único ARN mensajero precursor (pre–ARNm). Las secuencias de intrones se eliminan posteriormente del pre–ARNm mediante un proceso llamado empalme, que da como resultado el ARN mensajero maduro (ARNm). Al incluir diferentes combinaciones de exones, el empalme alternativo da lugar a ARNm que codifican distintas isoformas de proteínas.

[0004] El empalme del ARN es catalizado por el espliceosoma, un complejo dinámico de multiproteína–ARN compuesto por cinco ARN nucleares pequeños (snRNA U1, U2, U4, U5 y U6) y proteínas asociadas. El espliceosoma se ensambla en pre–ARNm para establecer una cascada dinámica de múltiples interacciones de ARN y proteínas que catalizan la escisión de los intrones y la ligadura de exones (Matera y Wang (2014) Nat Rev Mol Cell Biol. 15(2):108–21). La evidencia acumulada ha relacionado enfermedades humanas con la desregulación en el empalme del ARN que afecta a muchos genes (Scotti y Swanson (2016) Nat Rev Genet. 17(1):19–32).

[0005] El espliceosoma es un objetivo importante en la biología del cáncer. Varios estudios ahora han documentado alteraciones significativas en el perfil de empalme de las células cancerosas, así como en los propios factores de empalme (Agrawal *et al.* (2018) Curr Opin Genet Dev. 48:67–74). El empalme alternativo puede llevar a la inclusión / exclusión de exones diferenciales, a la retención de intrones o al uso de sitios de empalme crípticos (Seiler *et al.* (2018) Cell Rep. 23(1):282–296). En conjunto, estos eventos explican

los cambios funcionales que pueden contribuir a la tumorigénesis o la resistencia a la terapia (Siegfried y Karni (2018) Curr Opin Genet Dev. 48:16–21).

[0006] Ciertos productos naturales pueden unir el complejo de espliceosoma SF3b. Estas moléculas pequeñas modulan el empalme al promover la retención de intrones y/o la omisión de exones (Teng *et al.* (2017) Nat Commun. 8:15522). Una parte significativa de los transcriptos resultantes contienen codones de parada prematuros que desencadenan la desintegración del ARNm mediada sin sentido (NMD). Además, debido a que el empalme canónico está dañado, los transcriptos canónicos se reducen considerablemente, lo que puede afectar negativamente la función y la viabilidad celular. Por esta razón, los moduladores de empalme se han convertido en una clase prometedora de medicamentos para el tratamiento del cáncer (Puthenveetil *et al.* (2016) Bioconjugate Chem. 27:1880–8).

[0007] El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano protooncogénico (*HER2*) codifica un receptor de tirosina quinasa transmembrana que pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) (King *et al.*(1985) Science 229:974–6). La sobreexpresión de HER2 permite la activación constitutiva de las vías de señalización del factor de crecimiento, como la vía PI3K–AKT–mTOR, y por lo tanto sirve como conductor oncogénico en varios tipos de cáncer, incluyendo aproximadamente el 20% de los carcinomas de mama invasivos (Slamon *et al.* (1989) Science 244:707–12; Gajria y Chandarlapaty (2011) Expert Rev Anticancer Ther. 11:263–75). Dado que la amplificación de HER2 media en el fenotipo transformado, y debido a que la expresión de HER2 se restringe en gran medida a las células malignas, HER2 es un antígeno prometedor para atacar ciertos cánceres y/o administrar nuevos tratamientos contra el cáncer (Parakh *et al.* (2017) Cancer Treat Rev. 59:1–21). Los antígenos adicionales para la administración dirigida de terapias contra el cáncer incluyen, entre otros, CD138 (también denominado sindecan–1) y el receptor 2 de efrina tipo A (EPHA2).

[0008] CD138 es un proteoglicano de sulfato de heparán de superficie celular que es esencial para mantener la morfología celular y la interacción con el microentorno circundante (Akl *et al.* (2015) Oncotarget 6(30):28693–715; Szatmári *et al.* (2015) Dis Markers 2015:796052). En general, la pérdida de la expresión de CD138 en células de carcinoma reduce la adhesión celular a la matriz extracelular y aumenta la motilidad y la invasión celular (Teng *et al.* (2012) Matrix Biol. 31:3–16). El aumento de la expresión de CD138 estromal también altera la producción de fibronectina y la organización de la matriz extracelular (Yang *et al.* (2011) Am J Pathol. 178:325–35). Además, el aumento de la expresión de CD138 en los fibroblastos estromales se asocia con la angiogénesis y la

progresión del cáncer (Maeda *et al.* (2006) Oncogene 25:1408–12). La expresión de CD138 aumenta durante el desarrollo de las células B y su presencia es un sello distintivo de las células plasmáticas (Ribatti (2017) Immunol Lett. 188:64–7). La expresión de CD138 se mantiene en el mieloma múltiple, un tumor maligno de las células plasmáticas. Por lo tanto, CD138 es un antígeno atractivo para el tratamiento dirigido de varios tipos de cáncer y otras neoplasias malignas hematológicas (Sherbenou *et al.* (2015) Blood Rev. 29(2):81–91; Wijdenes *et al.* (1996) Br J Haematol. 94(2):318–23).

[0009] EPHA2 es una glicoproteína transmembrana que se sobreexpresa abundantemente en varias líneas celulares derivadas de cáncer maligno y en formas avanzadas de cáncer (Wykosky y Debinski (2008) Mol Cancer Ref. 6(12):1795–1806). Por ejemplo, EPHA2 está fuertemente sobreexpresado en aproximadamente el 61 % de los tumores de pacientes con GBM (Wykosky *et al.* (2008) Clin Cancer Res. 14:199–208), el 76% de los cánceres de ovario (Thaker *et al.* (2004) Clin Cancer Res. 10:5145–50) y el 85% de los adenocarcinomas de próstata (Zeng *et al.* (2003) Am J Pathol. 163:2271–6). La proteína EPHA2 está altamente sobreexpresada con respecto al porcentaje de tumores del paciente y el porcentaje de células dentro de un tumor, y es un receptor localizado en la membrana plasmática que puede internalizarse en la unión del ligando (Walker–Daniels *et al.* (2002) Mol Cancer Res. 1:79–87). Además, la expresión de EPHA2 se asocia con un mal pronóstico, aumento de metástasis y disminución de la sobrevida. Por lo tanto, debido a su patrón de expresión, localización e importancia funcional en el resultado de los pacientes con cáncer, EPHA2 es otro antígeno atractivo para la administración dirigida de nuevas terapias contra el cáncer.

[0010] En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona, en parte, nuevos compuestos con actividad biológica contra células neoplásicas. Los compuestos pueden retardar, inhibir y/o revertir el crecimiento de tumores en mamíferos, y pueden ser útiles para tratar a pacientes humanos con cáncer. En diversas formas de realización, la divulgación proporciona nuevos conjugados de anticuerpo–fármaco que emplean los nuevos compuestos u otras moléculas inhibidoras de empalme funcionales.

[0011] La presente divulgación se refiere más específicamente, en diversas formas de realización, a compuestos conjugados de anticuerpo–fármaco (ADC) que son capaces de unirse y destruir células neoplásicas. En diversas formas de realización, los compuestos ADC divulgados en este documento comprenden un enlazador que une un modulador de empalme a un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno. En diversas formas de realización, los compuestos ADC también son capaces de internalizarse en una célula blanco después de la unión.

[0012] En diversas formas de realización, los compuestos ADC pueden estar representados por la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica u otro blanco relacionado con la oncología;

D es un modulador de empalme;

L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

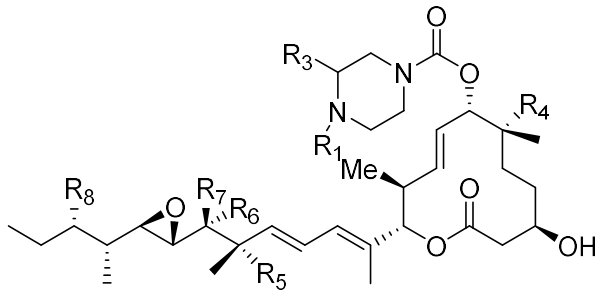
p es un número entero de 1 a 15.

[0013] En diversas formas de realización, los compuestos ADC pueden estar representados por la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica;

D es un modulador de empalme de Fórmula (II):



(II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C_3–C_8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

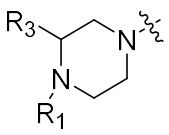
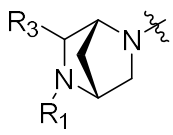
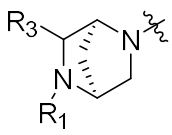
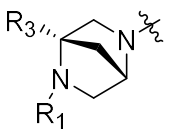
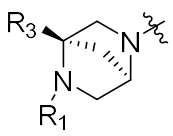
R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C_3–C_8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, $–O–C(=O)–R^{17}$, $–O–C(=O)–NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6 y $–NR^{15}R^{16}$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y $–C(=O)–O–R^{17}$;

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C_3–C_8; y

Z se selecciona de  ,  ,  ,  y  ;

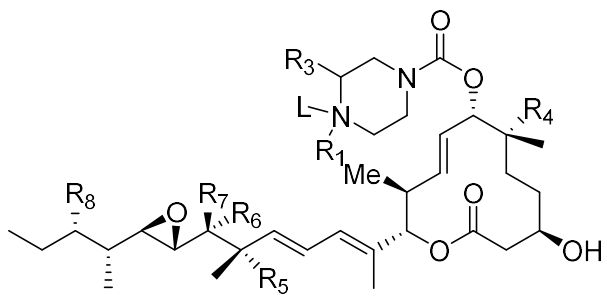
en donde R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo, y grupos heterociclilo C3–C8,

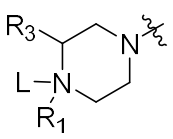
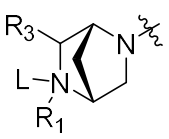
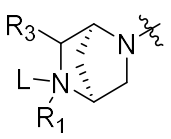
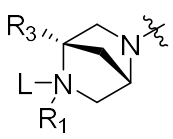
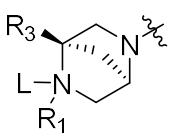
en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno;

y en donde L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0014] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de internalización en una célula blanco. En algunas formas de realización, el enlazador se une covalentemente al modulador de empalme de Fórmula (II) ("L–D"), y L–D tiene una estructura de Fórmula (II–A):


(II–A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde Z' se selecciona de  ,  ,  ,  y  ; y

en donde todas las demás variables son como se define para la Fórmula (II).

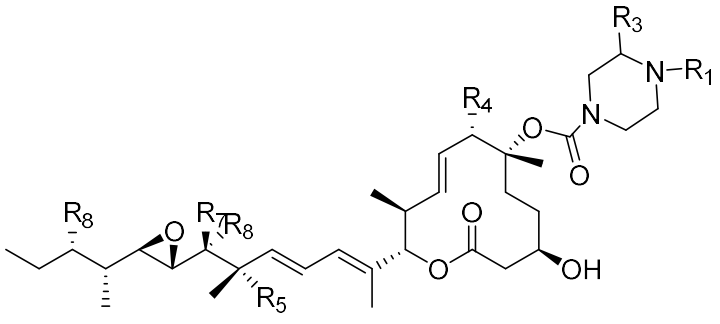
[0015] En diversas otras formas de realización, los compuestos ADC pueden estar representados por la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que

apunta a una célula neoplásica;

D es un modulador de empalme de Fórmula (IV):



(IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6 y $–NR^{15}R^{16}$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8,

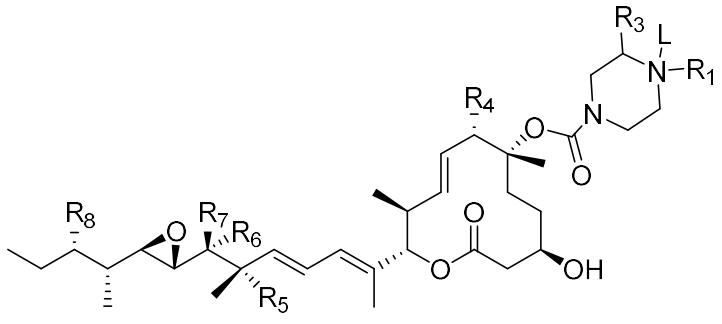
en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno;

y en donde L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0016] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de internalización en una célula blanco. En algunas formas de

realización, el enlazador se une covalentemente al modulador de empalme ("L–D"), y L–D tiene una estructura de Fórmula (IV–A):



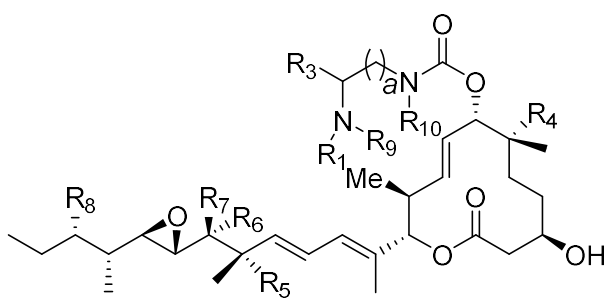
(IV–A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0017] En diversas otras formas de realización, los compuestos ADC pueden estar representados por la Fórmula (I):

$$Ab–(L–D)_p \qquad (I)$$

en donde Ab es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica;

D es un modulador de empalme de Fórmula (VI):



(VI), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 y R^9 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, –O–$C(=O)–R^{17}$, –O–$C(=O)–NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, $–NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{10} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos –C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17};

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

en donde R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), –$NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

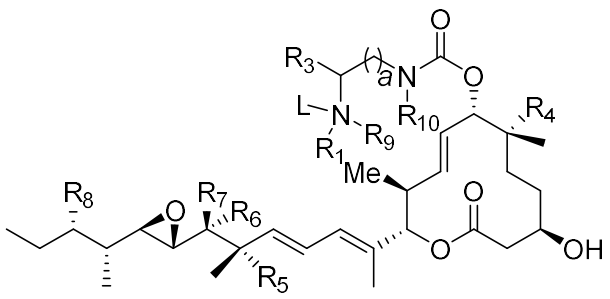
en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno; y

en donde R^1 y R^9 no pueden estar ambos ausentes;

y en donde L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0018] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es capaz de internalización en una célula blanco. En algunas formas de realización, el enlazador se une covalentemente al modulador de empalme ("L–D"), y L–D tiene una estructura de Fórmula (VI–A):



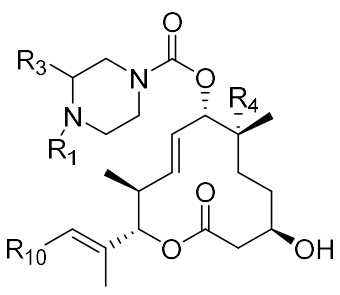
(VI–A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0019] En diversas otras formas de realización, compuestos ADC pueden estar representados por la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica;

D es un modulador de empalme de Fórmula (VIII):



(VIII), o una sal farmacéuticamente aceptable del

mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6; y

R^{10} se selecciona de carbociclos de 3 a 10 miembros y heterociclos de 3 a 10 miembros, cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 3 R^a, en donde cada R^a se selecciona independientemente de halógenos, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, $–S(=O)_w–$(heterociclos de 4 a 7 miembros), carbociclos de 4 a 7 miembros y heterociclos de 4 a 7 miembros;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^3, R^4, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), –(C=O)–(alquiloC1–C6)–(grupos heterociclilo C3–C10), grupos $–S(=O)_w–$(heterociclilo C3–C8) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, cada uno de los cuales está sustituido con 0, 1 o 2 grupos independientemente seleccionados de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$ y grupos alquilo C1–C3; y

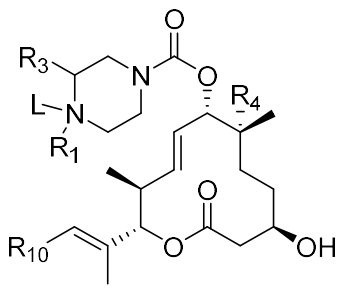
w es 0, 1 o 2;

y en donde L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0020] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno es capaz de internalización en una célula blanco. En algunas formas de realización, el enlazador se une covalentemente al modulador de empalme ("L–D"), y L–D tiene una estructura de Fórmula (VIII–A):



(VIII–A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0021] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende un modulador del complejo SF3b.

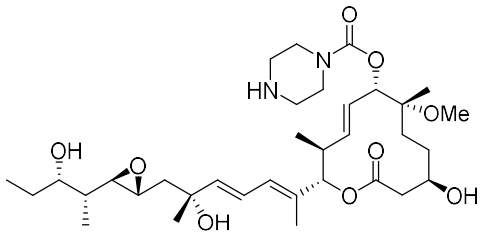
En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende una pladienolida o un derivado de pladienolida. En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende pladienolida D o un derivado de pladienolida D. En algunas formas de realización, la pladienolida D o el derivado comprende D2, D1, D4, D8, D10, D11 (E7107), D20, D21, D22, D12 o D25. En algunas formas de realización, la pladienolida D o el derivado comprende D2. En algunas formas de realización, la pladienolida D o el derivado comprende D1. En algunas formas de realización, la pladienolida D o el derivado comprende D4. En algunas formas de realización, la pladienolida D o el derivado comprende D12.

[0022] En algunas formas de realización, la pladienolida D o el derivado es una pladienolida D zwitteriónica o un derivado. En algunas formas de realización, la pladienolida D zwitteriónica o el derivado comprende D22 o D25.

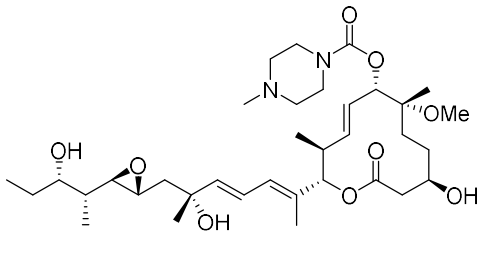
[0023] En algunas otras formas de realización, el modulador de empalme comprende pladienolida B o un derivado de pladienolida B. En algunas formas de realización, la pladienolida B o el derivado comprende D9, D18, D19 o D13.

En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende una aril pladienolida. En algunas formas de realización, la aril pladienolida comprende D15, D14, D16, D17, D26 o D33. En algunas formas de realización, la aril pladienolida comprende D15. En algunas formas de realización, la aril pladienolida es una aril pladienolida zwitteriónica. En algunas formas de realización, la aril pladienolida zwitteriónica comprende D33.

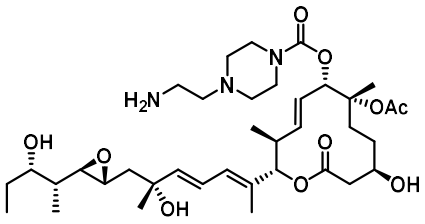
[0024] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D1:


(D1).

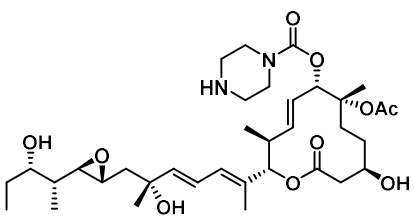
[0025] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D2:


(D2).

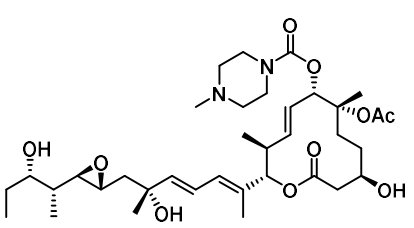
[0026] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D3:


(D3).

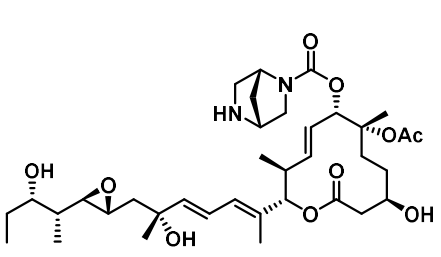
[0027] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D4:


(D4).

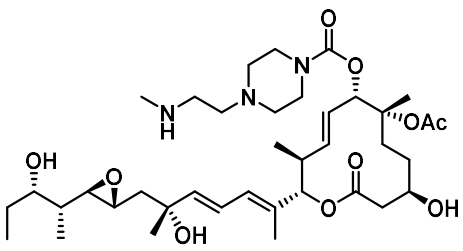
[0028] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D4':


(D4').

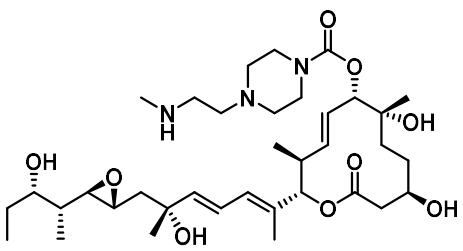
[0029] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D5:


(D5.)

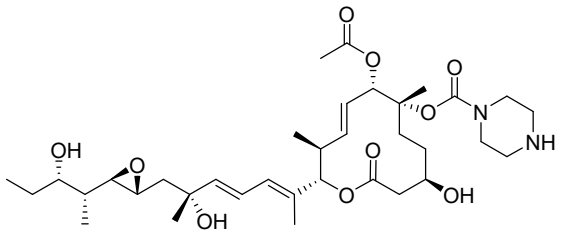
[0030] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D6:


(D6).

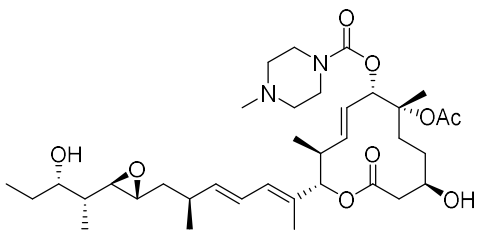
[0031] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D7:


(D7).

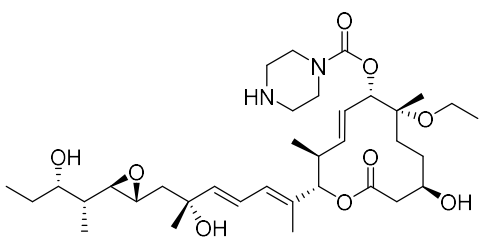
[0032] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D8:


(D8).

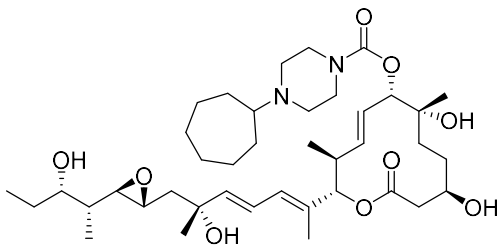
[0033] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D9:


(D9).

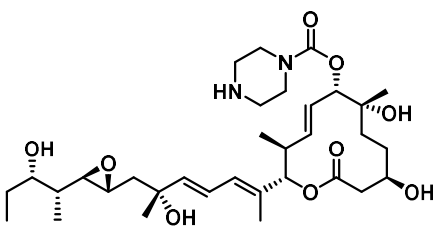
[0034] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D10:


(D10).

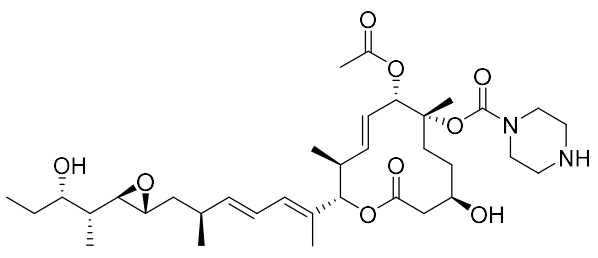
[0035] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D11:


(D11).

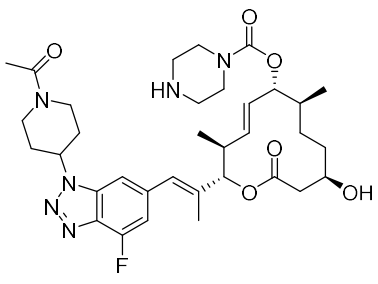
[0036] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D12:


(D12).

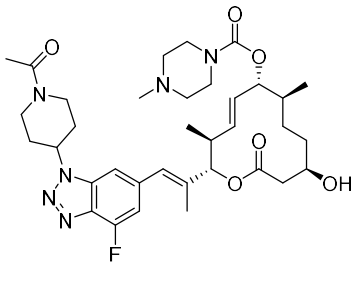
[0037] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D13:


(D13).

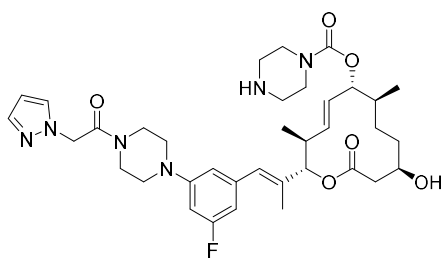
[0038] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D14:


(D14).

[0039] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D15:

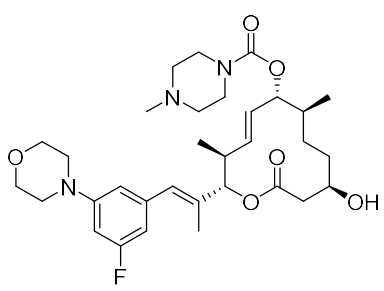

(D15).

[0040] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D16:



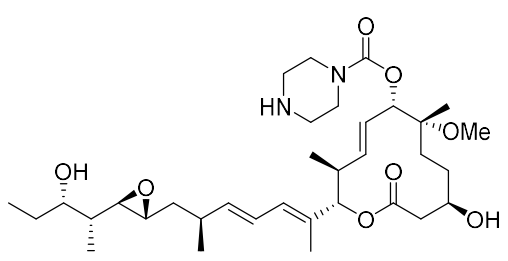
(D16).

[0041] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D17:



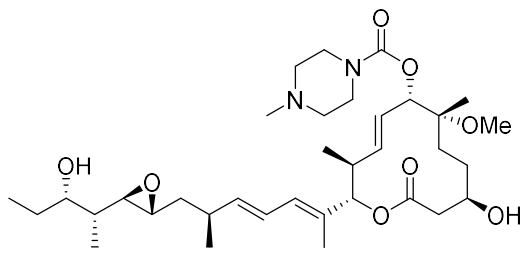
(D17).

[0042] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D18:



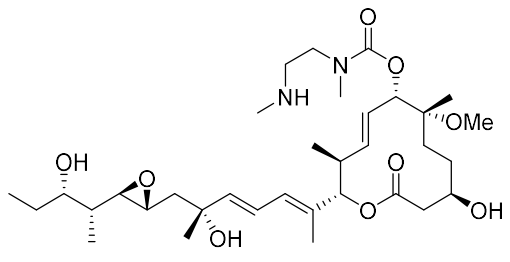
(D18).

[0043] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D19:



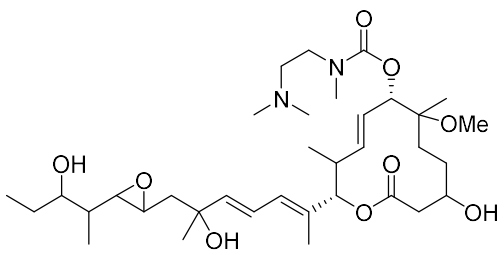
(D19).

[0044] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D20:

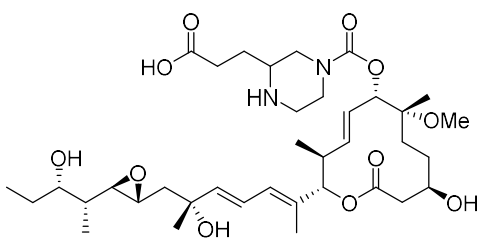


(D20).

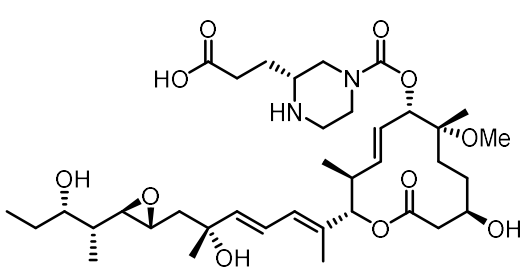
[0045] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D21:


(D21).

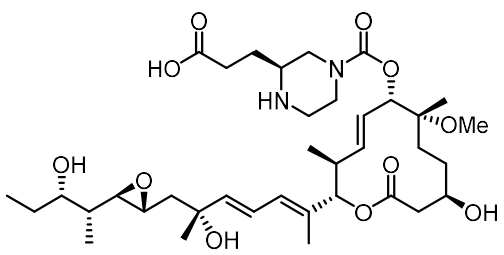
[0046] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D22:


(D22).

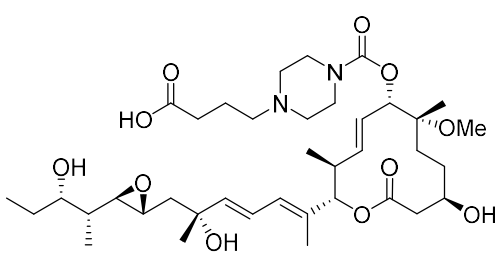
[0047] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D23:


(D23).

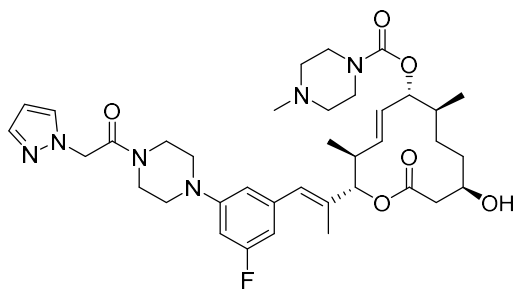
[0048] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D24:


(D24).

[0049] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D25:

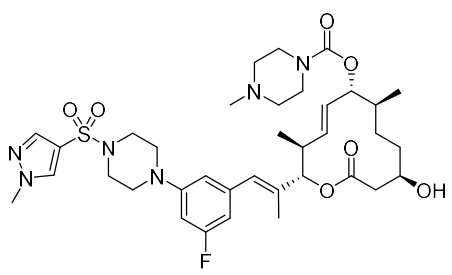

(D25).

[0050] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D26:



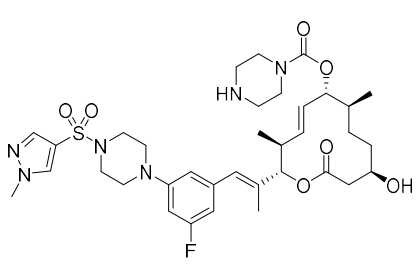
(D26).

[0051] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D27:



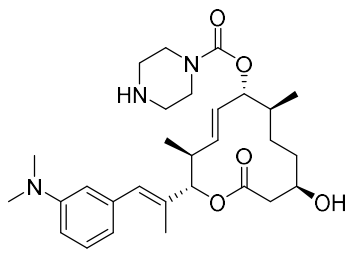
(D27).

[0052] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D28:



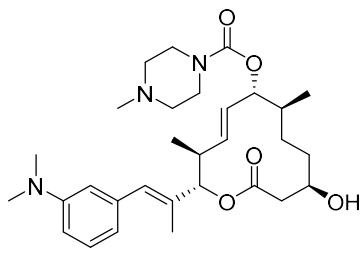
(D28).

[0053] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D29:



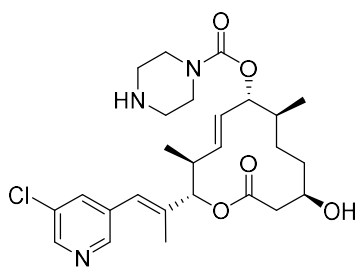
(D29).

[0054] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D30:



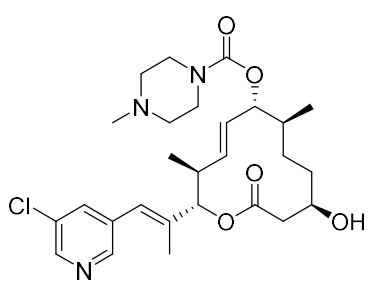
(D30).

[0055] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D31:



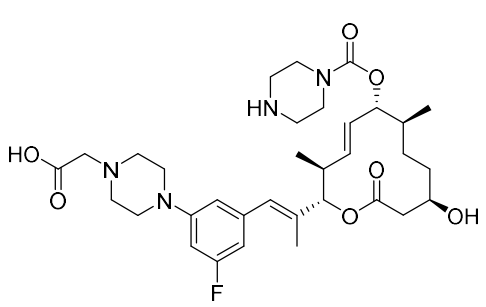
(D31).

[0056] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D32:



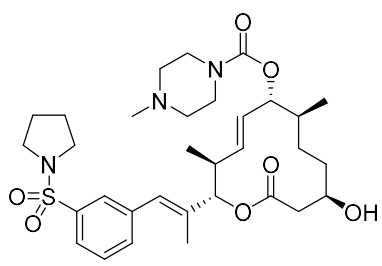
(D32).

[0057] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D33:



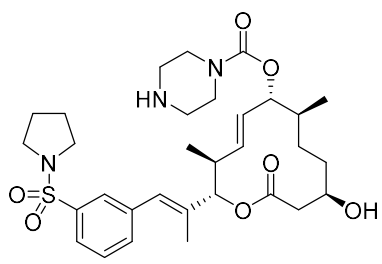
(D33).

[0058] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D34:



(D34).

[0059] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D35:



(D35).

[0060] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende uno de los restos farmacológicos enumerados en la Tabla 7. En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D1, D2, D3, D4, D4', D5, D6, D7, D8, D9,

D10, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19, D20, D21, D22, D23, D24, D25, D26, D27, D28, D29, D30, D31, D32, D33, D34 y/o D35.

[0061] En algunas formas de realización, se divulga un modulador de empalme, así como su uso como agente terapéutico solo o como parte de un ADC. En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D4, D4', D12, D15, D8, D9, D10, D13, D18, D19, D20, D21, D22, D25 o D33.

[0062] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D4 y el enlazador comprende MC–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D4 y el enlazador comprende MC–β–glucuronida. En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D12 y el enlazador comprende MC–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D12 y el enlazador comprende MC–β–glucuronida. En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D15 y el enlazador comprende MC–Val–Ala–pAB.

[0063] En diversas formas de realización, el enlazador usado en un ADC divulgado en la presente es estable fuera de la célula, de modo tal que el ADC permanece intacto cuando está presente en condiciones extracelulares, pero es capaz de escindirse tras la internalización en una célula, por ejemplo, una célula tumoral o cancerosa. En algunas formas de realización, el modulador de empalme se escinde del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno cuando el ADC ingresa en una célula que expresa un antígeno al que apunta el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC. En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador escindible.

[0064] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible es escindible por una enzima. En algunas formas de realización, el resto peptídico o enlazador escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido comprende valina–citrulina ("Val–Cit" o "VC"). En algunas otras formas de realización, la unidad de aminoácido comprende valina–alanina ("Val–Ala" o "VA"). En algunas otras formas de realización, la unidad de aminoácido comprende ácido glutámico–valina–citrulina ("Glu–Val–Cit" o "EVC"). En algunas otras formas de realización, la unidad de aminoácido comprende alanina–alanina–asparagina ("Ala–Ala–Asn" o "AAN").

[0065] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto de glucuronida escindible. En algunas formas de realización, el resto de glucuronida escindible es escindible por una enzima. En algunas formas de realización, el resto de glucuronida escindible es escindible por una glucuronidasa. En algunas formas de

realización, el resto de glucuronida escindible es escindible por β–glucuronidasa.

[0066] En algunas formas de realización, el enlazador comprende al menos una unidad espaciadora. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora o el enlazador comprende un resto de polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, el resto de PEG comprende $–(PEG)_m–$ y *m* es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, *m* es 2. En algunas otras formas de realización, la unidad espaciadora o el enlazador comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, el resto alquilo comprende $–(CH_2)_n–$ y *n* es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, *n* es 2. En algunas formas de realización, *n* es 5. En algunas formas de realización, *n* es 6.

[0067] En algunas formas de realización, la unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un resto maleimida (Mal) ("Mal–unidad espaciadora"). En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora es reactiva con un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

[0068] En algunas formas de realización, el enlazador comprende la Mal–unidad espaciadora y un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible o la unidad de aminoácido comprende Val–Cit. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible o la unidad de aminoácido comprende Val–Ala. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible o la unidad de aminoácido comprende Glu–Val–Cit. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible o la unidad de aminoácido comprende Ala–Ala–Asn. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto PEG. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC).

En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno al resto escindible en el enlazador. En algunas formas de realización, el resto escindible en el enlazador comprende un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible o la unidad de aminoácido comprende Val–Cit, Val–Ala, Glu–Val–Cit o Ala–Ala–Asn. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala. En algunas formas de realización, el enlazador

comprende MC–Glu–Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Ala–Ala–Asn. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto PEG. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC).

[0069] En algunas formas de realización, el resto escindible en el enlazador se une directamente al modulador de empalme, o una unidad espaciadora une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, la escisión del conjugado libera el modulador de empalme del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y enlazador. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora que une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme es auto–inmolante.

[0070] En algunas formas de realización, la unidad espaciadora que une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme comprende un p–aminobenciloxicarbonilo (pABC). En algunas formas de realización, el pABC une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, el resto escindible en el enlazador comprende un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible o unidad de aminoácido comprende Val–Cit, Val–Ala, Glu–Val–Cit o Ala–Ala–Asn. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pABC. En algunas otras formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Glu–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Ala–Ala–Asn–pABC.

[0071] En algunas formas de realización, la unidad espaciadora que une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme comprende un p–aminobencilo (pAB). En algunas formas de realización, el pAB une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, el resto escindible en el enlazador comprende un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible o la unidad de aminoácido comprende Val–Cit, Val–Ala Glu–Val–Cit o Ala–Ala–Asn. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pAB. En algunas otras formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pAB. En algunas otras formas de realización, el enlazador comprende Glu–Val–Cit–pAB. En algunas otras formas de realización, el enlazador comprende Ala–Ala–Asn–pAB.

[0072] En diversas formas de realización, el enlazador es un enlazador no

escindible. En algunas formas de realización, el modulador de empalme del ADC es liberado por degradación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador permanece covalentemente asociado con al menos un aminoácido del anticuerpo y fármaco tras la internalización y la degradación dentro de la célula blanco.

[0073] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador no escindible que comprende al menos una unidad espaciadora. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora o el enlazador comprende un resto de polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$ y *m* es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, *m* es 2. En algunas otras formas de realización, la unidad espaciadora o el enlazador comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, el resto alquilo comprende $–(CH_2)_n–$ o $–(CH_2)_n–O–(CH_2)_n$ y *n* es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, *n* es 2. En algunas formas de realización, *n* es 5. En algunas formas de realización, *n* es 6.

[0074] En algunas formas de realización, la unidad espaciadora en un enlazador no escindible se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un resto maleimida (Mal) (“Mal–unidad espaciadora”). En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora es reactiva con un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto PEG. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC) y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende $MC–(PEG)_2$. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende $MC–(PEG)_2$ y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende Mal–Hex. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende Mal–Hex y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende Mal–Et. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende Mal–Et y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora comprende Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, el enlazador o la Mal–unidad espaciadora

comprende Mal–Et–O–Et y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno al modulador de empalme.

[0075] En diversas formas de realización, los compuestos ADC pueden estar representados por la Fórmula (I):

$$Ab–(L–D)_p \qquad (I)$$

en donde Ab es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica u otro blanco relacionado con la oncología tal como un antígeno cancerígeno (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos o secuencias de dominio de unión divulgadas en la presente); D es cualquier molécula pequeña adecuada para tratar un cáncer (por ejemplo, un modulador de empalme, por ejemplo, cualquiera de los moduladores de empalme divulgados en la presente); L es un enlazador que une covalentemente Ab a D (por ejemplo, cualquiera de los enlazadores divulgados en la presente); y *p* es un número entero de 1 a 15.

[0076] En algunas formas de realización, Ab se selecciona de cualquiera de los anticuerpos o secuencias de dominio de unión divulgadas en la presente. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a HER2 y/o una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a CD138 y/o una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a EPHA2 y/o una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta apunta a MSLN y/o a una célula neoplásica que expresa MSLN. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a FOLH1 y/o una célula neoplásica que expresa FOLH1. En algunas formas de realizaciones, Ab es un anticuerpo o secuencia de domnio de unión que punta a CDH6 y/o una célula neoplásica que expresa CDH6. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a CEACAM5 y/o una célula neoplásica que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio o secuencia de dominio de unión que apunta a CFC1B y/o una célula neoplásica que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a ENPP3 y/o una célula neoplásica que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a FOLR1 y/o una célula neoplásica que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a HAVCR1 y/o célula neoplásica que expresa HAVCR1. En algunas

fromas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a KIT y/o una célula neoplásica que expresa KIT. En algunas fromas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a MET y/o una célula neoplásica que expresa MET. En algunas fromas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a MUC16 y/o una célula neoplásica que expresa MUC16. En algunas fromas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a SLC39A6 y/o una célula neoplásica que expresa SLC39A6. En algunas fromas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a SLC44A4 y/o una célula neoplásica que expresa SLC44A4. En algunas fromas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a STEAP1 y/o una célula neoplásica que expresa STEAP1. En algunas fromas de realización, Ab es un anticuerpo o secuencia de dominio de unión que apunta a otro antígeno canceroso.

[0077] En algunas formas de realización, D es un modulador de empalme. En algunas formas de realización, D se selecciona de cualquiera de los moduladores de empalme divulgados en la presente. En algunas formas de realización, D es un modulador de empalme seleccionado de D2, D1, D4, D8, D10, D11 (E7107), D20, D21, D22, D12, D25, D9, D18, D19, D13, D15, D14, D16, D17, D26 y D33, o cualquier derivado de los mismos. En algunas formas de realización, D es un modulador de empalme seleccionado de D4, D12, D15, D8, D9, D10, D13, D18, D19, D20, D21, D22, D25 y D33, o cualquier derivado de los mismos. En algunas formas de realización, D es un modulador de empalme que comprende D2 o cualquier derivado de los mismos. En algunas formas de realización, D es un modulador de empalme que comprende D1 o cualquier derivado de los mismos.

[0078] En algunas formas de realización, L se selecciona de cualquiera de los enlazadores divulgados en la presente, o cualquier combinación de componentes enlazadores divulgados en la presente. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC, Mal–$(PEG)_2$–CO, MC–Val–Ala–pAB, MC–Val–Ala–pABC, MC–Val–Cit–pAB, Mal–Hex, Mal–Et o Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, el enlazador también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL10, ADL12, ADL13, ADL14, ADL15, ADL21, ADL22 o ADL23. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL12, ADL14 o ADL15. En algunas formas de realización, el enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales.

En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL2 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL5 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL6 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL7 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL12 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL14 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL15 y opcionalmente puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En diversas formas de realización de los ADC descritos en la presente, *p* es de 1 a 10. En diversas formas de realización, *p* es de 2 a 8. En diversas formas de realización, *p* es de 4 a 8. En algunas formas de realización, *p* es 4. En algunas formas de realización, *p* es 8.

[0079] En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D1. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL6–D1. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D2. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D18. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D19. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL14–D1. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL12–D1. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL15–D1. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL12–D20. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL10–D1. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL12–D2. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL15–D2. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL12–D21. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL6–D9. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D4. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D3. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D12. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D7. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D6. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D5. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL22–D4. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D10. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D11. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D13. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D8. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D22. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D25. En algunas formas de realización, L–D de

Fórmula (I) es ADL12–D22. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D15. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D14. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D26. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D16. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D17. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D33. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D28. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D31. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D29. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D35. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D32. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL5–D27. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL12–D35. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL12–D28. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D23. En algunas formas de realización, L–D de Fórmula (I) es ADL1–D24.

[0080] En algunas formas de realización, se proporciona una combinación de ADC por lo cual se produce la conjugación aleatoria, y el valor *p* promedio de la combinación está entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8. En algunas formas de realización, se proporciona una combinación de ADC por lo cual se produce la conjugación aleatoria, y el valor *p* promedio de la combinación está entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8. En algunas formas de realización, se proporciona una combinación de ADC por lo cual se produce la conjugación aleatoria, y el valor *p* promedio de la combinación es de aproximadamente 4. En algunas formas de realización, se proporciona una combinación de ADC por lo cual se produce la conjugación aleatoria, y el valor *p* promedio de la combinación es de aproximadamente 8. En la presente se proporcionan composiciones (por ejemplo, las composiciones farmacéuticas) que comprenden múltiples copias de cualquiera de los ADC descritos, en donde la carga de fármaco promedio (*p* promedio) de los ADC en la composición es de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 5.5 (por ejemplo, aproximadamente 4), o de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 (por ejemplo, aproximadamente 8).

[0081] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (Ab) del ADC apunta a una célula neoplásica derivada de una neoplasia maligna hematológica o un tumor sólido. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula neoplásica derivada de una neoplasia maligna hematológica. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de una neoplasia maligna de células B, una leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda), un linfoma y un mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple). En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se

selecciona de leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula neoplásica derivada de un tumor sólido. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2–positivo), cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico), cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial uterino seroso), carcinoma de conductos salivales, melanoma, cáncer de colon, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama HER2–positivo, adenocarcinoma gástrico, cáncer de próstata y osteosarcoma.

[0082] En diversas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (Ab) del ADC es un anticuerpo anti–HER2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a HER2 y apunta a células neoplásicas que expresan HER2 (es decir, el ADC apunta a células neoplásicas que expresan HER2). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC es un anticuerpo anti–HER2 internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante del mismo.

[0083] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende secuencias de marco humanas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o

fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa o lambda humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o unión a antígeno compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:19 y un dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO:20.

[0084] En diversas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (Ab) del ADC es un anticuerpo anti–CD138 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a CD138 y apunta a células neoplásicas que expresan CD138 (es decir, el ADC apunta a células neoplásicas que expresan CD138). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC es un anticuerpo anti–CD138 internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante del mismo.

[0085] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende secuencias de marco humanas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2 murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa o lambda humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o unión a antígeno

compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:21 y un dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO:22.

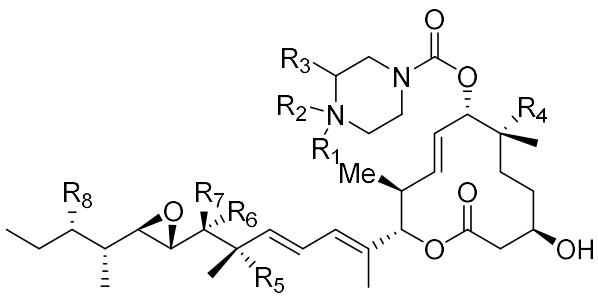
[0086] En diversas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (Ab) del ADC es un anticuerpo anti–EPHA2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a EPHA2 y apunta a células neoplásicas que expresan EPHA2 (es decir, el ADC apunta a células neoplásicas que expresan EPHA2). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC es un anticuerpo anti–EPHA2 internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante del mismo.

[0087] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno comprende secuencias de marco humanas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa o lambda humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o unión a antígeno compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:23 y un dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO:24.

[0088] También se proporcionan en la presente, en diversas formas de realización, compuestos que comprenden un enlazador–fármaco definido por la fórmula genérica: L–D, en donde L = un resto enlazador, y D = un resto farmacológico (por ejemplo, un resto

farmacológico de modulador de empalme). En diversas formas de realización, los compuestos enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente pueden unirse a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o son adecuados para usar en los ADC divulgados en la presente, por ejemplo, en los ADC de Fórmula (I).

[0089] En diversas formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (III). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (III):



(III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 está ausente o es un enlazador;

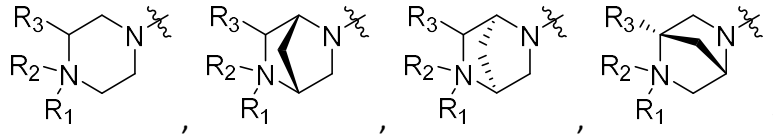
R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

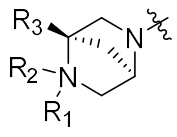
R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, $–O–C(=O)–R^{17}$, $–O–C(=O)–NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, $–NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, $–C(=O)–R^{17}$ y $–C(=O)–O–R^{17}$;

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

Z'' se selecciona de  y



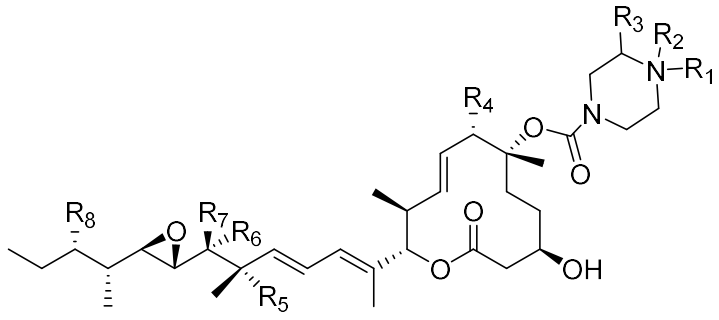
;

en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno; y

en donde si R^2 es un enlazador, entonces ni R^6 ni R^7 es un enlazador, y si R^6 o R^7 es un enlazador, entonces R^2 está ausente.

[0090] En diversas otras formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (V). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (V):



(V), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 está ausente o es un enlazador;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, $–NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

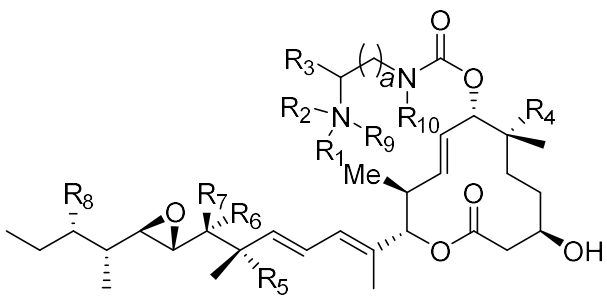
R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), –$NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno; y

en donde si R^2 es un enlazador, entonces ni R^6 ni R^7 es un enlazador, y si R^6 o R^7 es un enlazador, entonces R^2 está ausente.

[0091] En diversas otras formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (VII). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (VII):



(VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 y R^9 se seleccionan cada uno independientemente de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 está ausente o es un enlazador;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, –O–R^{17}, –O–

C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, –$NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{10} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos –C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17};

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

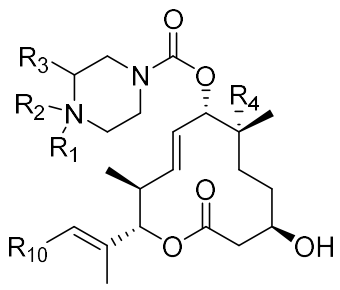
en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), –$NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno;

en donde si R^2 es un enlazador, entonces ni R^6 ni R^7 es un enlazador, y si R^6 o R^7 es un enlazador, entonces R^2 está ausente; y

en donde R^1 y R^9 no pueden estar ambos ausentes.

[0092] En diversas otras formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (IX). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (IX):



(IX), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 es un enlazador;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^{10} se selecciona de carbociclos de 3 a 10 miembros y heterociclos de 3 a 10 miembros, cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 3 R^a, en donde cada R^a se selecciona independientemente de halógenos, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, $–S(=O)_w–$(heterociclos de 4 a 7 miembros), carbociclos de 4 a 7 miembros y heterociclos de 4 a 7 miembros;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclilo C3–C10) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, cada uno de los cuales está sustituido con 0, 1 o 2 grupos independientemente seleccionados de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$ y grupos alquilo C1–C3; y

w es 0, 1 o 2.

[0093] Asimismo, en diversas formas de realización, en la presente se proporcionan usos terapéuticos para los compuestos ADC y las composiciones descritas, por ejemplo, en el tratamiento de un trastorno neoplásico, por ejemplo, un cáncer. En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno neoplásico, por ejemplo, un cáncer que expresa un antígeno al que apunta el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC, tal como HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4 o STEAP1.

[0094] En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz y/o un régimen de cualquiera de los ADC o composiciones descritas. En algunas formas de realización, el trastorno neoplásico es una neoplasia maligna hematológica o un tumor sólido. En

algunas formas de realización, el trastorno neoplásico es una neoplasia maligna hematológica. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de una neoplasia maligna de células B, una leucemia, un linfoma y un mieloma. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple. En algunas formas de realización, el trastorno neoplásico es un tumor sólido. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2–positivo), cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico), cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial uterino seroso), carcinoma de conductos salivales, melanoma, cáncer de colon, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama HER2–positivo, adenocarcinoma gástrico, cáncer de próstata y osteosarcoma.

[0095] En algunas formas de realización, el tratamiento con el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce la destrucción adicional de células neoplásicas que no expresan un antígeno blanco pero que son adyacentes a las células neoplásicas que expresan un antígeno blanco. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una o más células neoplásicas que expresan un antígeno blanco.

[0096] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es HER2. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama que expresa HER2, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial uterino seroso), osteosarcoma o carcinoma de conductos salivales. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–HER2 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0097] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CD138. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un mieloma múltiple que expresa CD138. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CD138 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0098] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es EPHA2. En algunas

formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama que expresa EPHA2, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de colon o cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–EPHA2 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0099] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MSLN. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario que expresa MSLN, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas o cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón). En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–MSLN cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0100] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es FOLH1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–FOLH1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0101] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CDH6. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CDH6 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0102] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CEACAM5. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer colorrectal que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CEACAM5 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0103] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CFC1B. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de páncreas que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CFC1B cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0104] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es ENPP3. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–ENPP3 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0105] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es FOLR1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–FOLR1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0106] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es HAVCR1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón o cáncer de esófago que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–HAVCR1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0107] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es KIT. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa KIT. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–KIT cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0108] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MET. En algunas

formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón o cáncer de esófago que expresa MET. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–MET cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0109] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MUC16. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario, cáncer de cérvix o cáncer de mama que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–MUC16 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0110] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es SLC39A6. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama o cáncer de próstata que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–SLC39A6 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0111] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es SLC44A4. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–SLC44A4 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0112] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es STEAP1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa STEAP1r. En algunas formas de realización, el sujeto no responde o responde poco al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–STEAP1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento con un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0113] En ciertos otros aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto que tiene o se sospecha

que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz y/o un régimen de cualquiera de los ADC o composiciones descritas.

[0114] En algunas formas de realización, el tratamiento con el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce la destrucción adicional de células tumorales neoplásicas que no expresan un antígeno blanco pero son adyacentes a células tumorales neoplásicas que expresan un antígeno blanco. En algunas formas de realización, el tumor comprende una o más células neoplásicas que expresan un antígeno blanco.

[0115] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es HER2. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama que expresa HER2, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial uterino seroso), osteosarcoma o carcinoma de conductos salivales. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–HER2 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0116] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CD138. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un mieloma múltiple que expresa CD138. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CD138 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0117] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es EPHA2. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama que expresa EPHA2, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de colon o cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–EPHA2 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0118] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MSLN. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario que expresa MSLN, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas o cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón). En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–MSLN cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0119] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es FOLH1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o

refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–FOLH1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0120] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CDH6. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CDH6 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0121] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CEACAM5. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer colorrectal que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CEACAM5 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0122] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CFC1B. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de páncreas que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–CFC1B cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0123] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es ENPP3. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–ENPP3 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0124] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es FOLR1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–FOLR1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0125] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es HAVCR1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón o cáncer de esófago que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–HAVCR1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0126] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es KIT. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa KIT. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–KIT cuando se administra solo y/o (b) un

modulador de empalme cuando se administra solo.

[0127] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MET. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón o cáncer de esófago que expresa MET. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–MET cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0128] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MUC16. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario, cáncer de cérvix o cáncer de mama que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–MUC16 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0129] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es SLC39A6. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama o cáncer de próstata que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–SLC39A6 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0130] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es SLC44A4. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–SLC44A4 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0131] En algunas formas de realización, el antígeno blanco es STEAP1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa STEAP1. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con (a) un anticuerpo anti–STEAP1 cuando se administra solo y/o (b) un modulador de empalme cuando se administra solo.

[0132] En incluso otros aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para determinar si un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico responderá al tratamiento con cualquiera de los ADC o composiciones descritas al proporcionar una muestra biológica del sujeto y poner en contacto la muestra biológica con el ADC o la composición. En algunas formas de realización, la muestra biológica es una muestra tumoral. En algunas formas de realización, la muestra tumoral es una biopsia tumoral o muestra de sangre. En algunas formas de realización, la muestra de sangre se selecciona de sangre, una fracción de sangre o una célula obtenida de la sangre o la fracción de sangre. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una o más células neoplásicas que expresan un antígeno blanco. En algunas formas de realización, el

antígeno blanco es HER2. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama que expresa HER2, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial uterino seroso), osteosarcoma o carcinoma de conductos salivales. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CD138. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un mieloma múltiple que expresa CD138. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es EPHA2. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama que expresa EPHA2, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de colon o cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MSLN. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario que expresa MSLN, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas o cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón). En algunas formas de realización, el antígeno blanco es FOLH1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CDH6. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CEACAM5. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer colorrectal que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es CFC1B. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de páncreas que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es ENPP3. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es FOLR1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es HAVCR1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón o cáncer de esófago que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es KIT. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón que expresa KIT. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MET. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de riñón o cáncer de esófago que expresa MET. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es MUC16. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de ovario, cáncer de cérvix o cáncer de mama que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es SLC39A6. En algunas formas de realización, la una o más

células neoplásicas se derivan de un cáncer de mama o cáncer de próstata que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es SLC44A4. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el antígeno blanco es STEAP1. En algunas formas de realización, la una o más células neoplásicas se derivan de un cáncer de próstata que expresa STEAP1.

[0133] También se proporciona en la presente, en diversas formas de realización, composiciones farmacéuticas que comprenden un ADC y un diluyente, portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. También se divulgan métodos para producir los compuestos ADC y las composiciones descritas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0134] La **FIG. 1** muestra la respuesta a la dosis de compuestos de carga útil ejemplares en un ensayo de unión competitiva. Se inmunoprecipitaron extractos nucleares de células 293F que sobreexpresaban SF3B1 marcado con marcador de tipo salvaje con un anticuerpo anti–SF3B1 y cóctel de perlas de ensayo de proximidad de centelleo (SPA). Las reacciones de unión contenían la mezcla de anticuerpo–perla y concentraciones crecientes de compuesto, seguido por la competencia con una sonda de pladienolida marcada con ^{3}H (PB). El eje Y representa el porcentaje de cambio (% de respuesta) de la unión específica en relación con el control de DMSO (0 %). Los datos se representan como media ± desviación estándar (SD).

[0135] La **FIG. 2** muestra la modulación del empalme por compuestos de carga útil ejemplares en un ensayo de empalme *in vitro*. Los extractos nucleares de células HeLa S3 se incubaron con Ad2.2 pre–ARNm y concentraciones crecientes de compuesto, seguido de la cuantificación de la modulación de empalme a través de RT–PCR. La secuencia Ad2.2 se deriva del sustrato de pre–ARNm Ad2 adenoviral con modificaciones alrededor de la secuencia del punto de ramificación. El eje Y representa el porcentaje de cambio (% de respuesta) del empalme en relación con el control de DMSO (0 %). Los datos se representan como media ± SD.

[0136] La **FIG. 3** muestra la respuesta a la dosis de viabilidad de compuestos de carga útil ejemplares en células de cáncer de mama amplificadas con HER2 (HCC1954). Las células se incubaron con el compuesto durante 144 horas (6 días), y se leyó la viabilidad en reactivo CellTiter–Glo®. Los datos se representan como media ± SD.

[0137] La **FIG. 4** muestra los resultados de un ensayo de unión celular. La unión de los HER2–ADC ejemplares a células JIMT1 se evaluó mediante citometría de flujo. Los valores de intensidad de fluorescencia media se midieron para determinar la unión de los conjugados, seguidos de los secundarios marcados con PE. Los datos se representan como

media ± SD.

[0138] La **FIG. 5A** muestra la respuesta a la dosis de viabilidad de HER2–ADC ejemplares en células de cáncer de mama amplificadas con HER2 (HCC1954). La **FIG. 5B** muestra la respuesta a la dosis de viabilidad de HER2–ADC ejemplares en células de cáncer gástrico amplificadas con HER2 (N87). La **FIG. 5C** muestra la respuesta a la dosis de viabilidad de HER2–ADC ejemplares en células de cáncer de mama amplificadas con HER2 (SKBR3). Las células se incubaron con conjugados durante 144 horas (6 días), y se leyó la viabilidad en reactivo CellTiter–Glo®. Los datos se representan como media ± SD.

[0139] La **FIG. 6** muestra la respuesta a la dosis de viabilidad de HER2–ADC ejemplares en células de cáncer de mama que no expresan HER2 (MCF7). Las células se incubaron con conjugados durante 144 horas (6 días), y se leyó la viabilidad en reactivo CellTiter–Glo®. Los datos se representan como media ± SD.

[0140] La **FIG. 7** muestra los resultados de un ensayo de empalme SLC25A19 en células de cáncer de mama amplificadas con HER2 (HCC1954). Las células se incubaron con conjugados durante 24 horas, y se midió el empalme del transcripto SLC25A19 en una reacción de qPCR en tiempo real con un conjunto específico de cebador–sonda Taqman. El eje Y representa el porcentaje (%) de respuesta en relación con el control de DMSO (0 %). Los datos se representan como media ± SD.

[0141] La **FIG. 8** muestra los resultados de un ensayo de destrucción adicional. Las células H1568 que sobreexpresan células HER2 (blanco positivas) o H1568 marcadas con luciferasa (blanco negativas) colocadas en placas solas o incubadas juntas en cocultivo durante 144 horas (6 días) se trataron con HER2–ADC ejemplares. Las placas se leyeron con reactivo OneGlo®. El eje Y representa el porcentaje (%) de respuesta en relación con el control de PBS (100 %). Los datos se representan como media ± SD.

[0142] La **FIG. 9** muestra la cinética del crecimiento tumoral para cada grupo de ratones CB17–SCID implantados con HCC1954 tratados con una única dosis intravenosa de un HER2–ADC ejemplar o una carga útil correspondiente de igual dosis (6–10 animales por grupo). Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana después del tratamiento. Los datos se representan como media ± error estándar de la media (SEM).

[0143] La **FIG. 10** muestra la respuesta a la dosis de viabilidad de CD138–ADC ejemplares en una línea celular de mieloma múltiple que expresa CD138. Las células MOLP8 se incubaron con conjugados durante 144 horas (6 días), y se leyó la viabilidad en reactivo CellTiter–Glo®. Los datos se representan como media ± SD.

[0144] La **FIG. 11** muestra la respuesta a la dosis de viabilidad de EPH2A–ADC ejemplares en una línea celular de cáncer de próstata que expresa EPHA2. Las células PC3 se incubaron con conjugados durante 144 horas (6 días), y se leyó la viabilidad en reactivo

CellTiter–Glo®. Los datos se representan como media ± SD.

[0145] La **FIG. 12A** y la **FIG. 12B** muestran los resultados de un ensayo de estabilidad *in vitro* para un ADC anti–HER2 ejemplar, AB185–ADL1–D1. El eje Y representa la concentración del anticuerpo total (**FIG. 12A**) y la carga útil conjugada (intacta) (**FIG. 12B**); el eje X representa el tiempo medido en horas a 37 °C.

[0146] La **FIG. 13** muestra las concentraciones plasmáticas de un ADC anti–HER2 ejemplar, AB185–ADL1–D1, después de una dosis intravenosa única en ratones portadores de tumores CD17–SCID N87.

[0147] La **FIG. 14** muestra un diagrama esquemático de una secuenciación de ARN ejemplar y un experimento de ligandoma de proteínas.

[0148] La **FIG. 15** muestra un diagrama esquemático de un experimento de cebado de células T ejemplar.

[0149] La **FIG. 16** muestra los resultados de un análisis FACS. Los monocitos se aislaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se indujeron a diferenciarse en células dendríticas (DC) a través del cultivo en un cóctel de citoquinas. Se realizó FACS para validar la maduración de DC a partir de monocitos.

[0150] Las **FIGS. 17A–D** muestran los resultados de un ensayo ELISpot. La **FIG. 17A** muestra placas ELISpot que indican el cebado con Neoantígeno 1 de la activación de células T CD8+. La estimulación de las células T CD8+ se monitoreó mediante la secreción de IFNγ. La **FIG. 17B** muestra la cuantificación de manchas de IFNγ (número de mancha) en placas ELISpot de Neoantígeno 1 (**FIG. 17A**). La **FIG. 17C** muestra placas ELISpot que indican el cebado con Neoantígeno 3 de la activación de células T CD8+. La estimulación de las células T CD8+ se monitoreó mediante la secreción de IFNγ. La **FIG. 17D** muestra la cuantificación de manchas de IFNγ (veces de cambio) en placas ELISpot de Neoantígeno 3 (**FIG. 17C**).

[0151] La **FIG. 18** muestra un gráfico que compara la potencia de empalme (IC50 qPCR) contra la potencia celular (GI50 CTG) para ADC anti–HER2 ejemplares en células de cáncer de mama HCC1954. Los valores mostrados son determinados por letalidad celular y sombreados por profundidad de la respuesta de empalme alternativa.

[0152] La **FIG. 19** muestra un gráfico que compara la potencia de empalme (IC50 qPCR) contra la potencia celular (GI50 CTG) para ADC anti–HER2 ejemplares en células de cáncer gástrico N87. Los valores mostrados son determinados por letalidad celular y sombreados por profundidad de la respuesta de empalme alternativa.

[0153] La **FIG. 20** muestra un gráfico que compara la potencia y la letalidad de ADC anti–HER2 ejemplares (en células de cáncer de mama HCC1954) contra la estabilidad y permeabilidad de cargas útiles correspondientes. Los valores mostrados son

determinados por estabilidad de carga útil y sombreados por permeabilidad de carga útil.

[0154] La **FIG. 21** muestra la cinética del crecimiento tumoral para cada grupo de ratones CB17–SCID implantados con N87 tratados por vía intravenosa con vehículo o 10 mg/kg de trastuzumab, TDM1 o un HER2–ADC Q7D ejemplar por 2 ciclos (N=8 por grupo). Los datos se representan como media ± error estándar de la media (SEM) (mm^3).

[0155] La **FIG. 22** muestra el cambio de peso corporal para cada grupo de ratones CB17–SCID implantados con N87 tratados por vía intravenosa con vehículo o 10 mg/kg de trastuzumab, TDM1 o un HER2–ADC Q7D ejemplar por 2 ciclos (N=8 por grupo). Los datos se representan como media ± error estándar de la media (SEM) (%).

[0156] La **FIG. 23** muestra la cinética del crecimiento tumoral (izquierda) y el cambio de peso corporal (derecha) para cada grupo de ratones CB17–SCID implantados con N87 tratados por vía intravenosa con vehículo o 10 mg/kg de trastuzumab, TDM1 o un HER2–ADC Q7D ejemplar por 2 ciclos (N=8 por grupo). Los datos se representan como media ± error estándar de la media (SEM) (volumen tumoral, mm^3) o media ± SEM (peso corporal, %).

[0157] Las **FIGS. 24A**–**24D** muestran la modulación farmacodinámica (PD) de uniones de ARNm en ratones CB17–SCID implantados con N87 tratados por vía intravenosa con vehículo o 10 mg/kg de trastuzumab, TDM1 o un HER2–ADC Q7D ejemplar por 2 ciclos. La RT–qPCR de FBXW5 (transcripto de ARNm maduro) se monitoreó y se muestra en la **FIG. 24A** y la **FIG. 24C**. La RT–qPCR de TAOK1 (transcripto de neounión) se monitoreó y se muestra en la **FIG. 24B** y la **FIG. 24D**. Los animales (N=4 por grupo) se recolectaron a las 48 horas (**FIG. 24A** y **FIG. 24B**) o en los momentos indicados (**FIG. 24C** y **FIG. 24D**). Los tumores se aislaron para la extracción de ARN y RT–qPCR.

[0158] La **FIG. 25** muestra un diagrama esquemático de un análisis ilustrativo de la indicación blanco.

[0159] La **FIG. 26** muestra un esquema de bioconjugación ilustrativo para la preparación de ADC utilizando moduladores de empalme.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

[0160] Las composiciones y los métodos divulgados se pueden comprender mejor con referencia a la descripción que se detalla a continuación tomada en conexión con las figuras adjuntas, que forman parte de esta divulgación.

[0161] A lo largo del presente texto, las descripciones se refieren a composiciones y métodos para usar las composiciones. Cuando en la divulgación se describe o reivindica una característica o forma de realización con una composición, tal característica o forma de realización se puede aplicar por igual a los métodos para usar la composición. De la misma manera, cuando en la divulgación se describe o reivindica una característica o

forma de realización asociada con un método para usar una composición, dicha característica o forma de realización se puede aplicar por igual a la composición.

[0162] Cuando se expresa un rango de valores, incluye las formas de realización que usan un valor específico dentro del rango. Además, la referencia a los valores que se mencionan en rangos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese rango. Todos los rangos incluyen sus extremos y son combinables. Cuando los valores se expresan como aproximaciones, por uso del antecedente «aproximadamente», se entenderá que ese valor específico determina otra forma de realización. La referencia a un valor numérico específico incluye al menos un valor específico, a menos que el contexto indique lo contrario con claridad. El uso de «o» significará «y/o», a menos que el contexto específico indique lo contrario. Todas las referencias que se citan en la presente se incorporan por referencia para cualquier propósito. De existir conflicto entre una referencia y la memoria descriptiva, prevalecerá la memoria descriptiva.

[0163] Se debe apreciar que ciertas características de las composiciones y los métodos divulgados que, para mayor claridad, se describen en la presente en el contexto de varias formas de realización separadas también se pueden aportar en combinación en una forma de realización sola. Por el contrario, varias características de las composiciones y los métodos divulgados que, para mayor brevedad, se describen en la presente en el contexto de una sola forma de realización también se pueden aportar por separado o en cualquier subcombinación.

Definiciones

[0164] Se usan varios términos en relación con aspectos de la descripción a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. Tales términos tendrán sus significados habituales en el arte a menos que se indique lo contrario. Otros términos con definiciones específicas se interpretarán de manera coherente con las definiciones que se proveen en la presente.

[0165] Tal como se usan en la presente, las formas singulares «un», «una» y «el», «la» incluyen las formas plurales, a menos que el contexto indique lo contrario con claridad.

[0166] Los términos «cerca de» o «aproximadamente» en el contexto de valores y rangos numéricos se refieren a los valores o rangos que se aproximan a los valores o rangos recitados o están cerca de ellos tal que la forma de realización se pueda realizar según lo previsto, tal como tener una cantidad deseada de ácidos nucleicos o polipéptidos en una mezcla de reacción, como resultará evidente para el experto en el arte de las enseñanzas que contiene la presente. En algunas formas de realización, «cerca de» significa más o menos 10% de una cantidad numérica.

[0167] Los términos «conjugado anticuerpo–fármaco», «conjugado de anticuerpo», «conjugado», «inmunoconjugado» y «ADC» (por su sigla en inglés) se usan de manera indistinta y se refieren a uno o más de los compuestos terapéuticos (por ej., un modulador de empalme) que se enlaza a uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos y se define mediante la fórmula genérica: $Ab–(L–D)_p$ (Fórmula I), donde Ab = un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, L = un resto enlazador, D = un resto de fármaco (por ejemplo, un resto de fármaco modulador de empalme), y *p* = el número de restos de fármaco o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Un ADC que comprende un resto de fármaco modulador de empalme también se puede mencionar en la presente de manera más específica como un «anticuerpo cargado de modulador de empalme», o «SMLA». En los ADC que comprenden un resto de fármaco modulador de empalme, «*p*» se refiere al número de compuestos moduladores de empalme enlazados al anticuerpo o al fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador L puede incluir un resto escindible entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el compuesto terapéutico. En algunas formas de realización, el enlazador L puede incluir un resto escindible que se puede unir a uno o ambos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el compuesto terapéutico mediante unidades espaciadoras. En algunas formas de realización, cuando una unidad espaciadora se une al resto escindible del compuesto terapéutico, es una unidad espaciadora que se autoinmola. En otras formas de realización, el enlazador L no incluye un resto escindible, y es un enlazador no escindible. En algunas formas de realización, el enlazador L puede incluir al menos una unidad espaciadora que se puede unir directamente al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y al compuesto terapéutico. Los ejemplos de enlazadores escindibles y no escindibles se describen y ejemplifican en la presente.

[0168] El término «anticuerpo» se usa en el sentido más amplio para referirse a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une de manera específica a un objetivo, tal como una proteína, un polipéptido, un carbohidrato, un polinucleótido, un lípido o combinaciones de ellos a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. La cadena pesada de un anticuerpo está compuesta de un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La cadena ligera está compuesta de un dominio variable de cadena ligera (V_L) y un dominio constante de cadena ligera (C_L). A los fines de la presente solicitud, los dominios maduros de cadena pesada y cadena ligera comprenden cada uno tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) dentro de cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3, y FR4) distribuidas desde el extremo N–terminal hasta el extremo C–terminal : FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y

FR4. Un «anticuerpo» puede ocurrir en la naturaleza o se puede fabricar, tal como los anticuerpos monoclonales que se producen por tecnología convencional de hibridoma. El término «anticuerpo» incluye anticuerpos monoclonales de longitud total y anticuerpos policlonales de longitud total, así como también fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, y anticuerpos de cadena simple. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o sus subclases (por ej., los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). El término abarca además anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpo humanizados, y cualquier molécula de inmunoglobulina modificada que contenga un sitio de reconocimiento de antígeno, siempre que demuestre la actividad biológica deseada (por ej., se une al antígeno objetivo, se internaliza dentro de una célula que expresa en antígeno objetivo).

[0169] El término «anticuerpo monoclonal», tal como se lo usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población homogénea en gran medida de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que conforman la población son idénticos excepto por mutaciones de ocurrencia natural que puedan estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo epítopo antigénico. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales en general incluyen una multitud de anticuerpos que se dirigen a epítopos diferentes (o son específicos para ellos). El modificador «monoclonal» indica la naturaleza del anticuerpo en cuanto a si se obtuvo de una población homogénea en gran medida de anticuerpos, y no se interpretará que exige la producción de anticuerpos por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente divulgación se pueden obtener mediante el método de hibridoma que describió primero Kohler et al. (1975) Nature 256:495, o se puede obtener mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ej., la patente estadounidense No. 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos fagos con las técnicas que describió Clackson et al. (1991) Nature 352:624–8, y Marks et al. (1991) J Mol Biol. 222:581–97, por ejemplo.

[0170] Los anticuerpos monoclonales que se describen en la presente incluyen en particular los anticuerpos «quiméricos», en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie determinada o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpos específicos, mientras que el resto de la cadena es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que unan de manera específica en antígeno objetivo y/o exhiben la actividad

biológica deseada.

[0171] El término «anticuerpo humano», tal como se lo usa en la presente, se refiere a un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que produce un ser humano.

[0172] El término «anticuerpo quimérico», tal como se lo usa en la presente, se refiere a los anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. En algunas instancias, las regiones variables de ambas cadenas pesada y ligera corresponden a las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie con la especificidad, afinidad y actividad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a anticuerpos derivados de otras especies (por ej., seres humanos) para minimizar una respuesta inmunológica en estas últimas especies.

[0173] Tal como se lo usa en la presente, el término «anticuerpo humanizado» se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ej., murino) así como también anticuerpos humanos. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprende en gran medida todos de al menos uno, y usualmente dos, dominios variables, en los que todos o casi todos de los bucles hipervariables corresponden a la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones marco (FR) son las de la secuencia de inmunoglobulina humana. Como opción el anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, usualmente la de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado se puede modificar más mediante la sustitución de residuos, ya sea en la región marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, la afinidad y/o la actividad del anticuerpo.

[0174] El término «fragmento de unión a antígeno», o «parte de unión a antígeno», tal como se lo usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un antígeno o proteína que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ej., HER2, CD138, EPHA2, , MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4, STEAP1). Los fragmentos de unión a antígeno también pueden retener la capacidad de internalizarse en una célula de expresión de antígeno. En algunas formas de realización, los fragmentos de unión a antígeno también retienen actividad efectora inmunológica. Se ha demostrado que los fragmentos de anticuerpo de longitud total pueden realizar la función de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud total. Los ejemplos de los fragmentos de unión

dentro del alcance del término «fragmento de unión a antígeno» o «parte de unión a antígeno» de un anticuerpo incluyen (i) fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmento Fd que consta de los dominios V_H y C_{H1}; (iv) fragmento Fv que consta de los dominios V_L y V_H de una sola rama de un anticuerpo; (v) fragmento dAb, que comprende un dominio variable solo, por ej., un dominio V_H (ver, por ej., Ward et al. (1989) Nature 341:544–6; y publicación internacional No. WO 1990/005144); y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR). Más aún, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados para genes distintos, se pueden unir, con métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite que se formen como una cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv)). *Ver, por ej*., Bird et al. (1988) Science 242:423–6; y Huston et al. (1988) Proc Natl Acad Sci. USA 85:5879–83. Dichos anticuerpos de cadena simple también ser prevén dentro del alcance del término «fragmento de unión a antígeno» o «parte de unión a antígeno» de un anticuerpo, y se los conoce en el arte como tipos de ejemplo de fragmento de unión que se puede internalizar en células con la unión (ver, por ej., Zhu et al. (2010) 9:2131–41; He et al. (2010) J Nucl Med. 51:427–32; y Fitting et al. (2015) MAbs 7:390–402). En ciertas formas de realización, las moléculas scFv se pueden incorporar a una proteína de fusión. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como diacuerpos, también quedan dentro del alcance. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes bioespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero que usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, y así fuerzan que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y así crean dos sitios de unión a antígeno (ver, por ej., Holliger et al. (1993) Proc Natl Acad Sci. USA 90:6444–8; y Poljak et al. (1994) Structure 2:1121–3). Los fragmentos de unión a antígeno se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas para el experto en el arte, y los fragmentos de unión se seleccionar por utilidad (por ej., afinidad de unión, internalización) de la misma manera que si fueran anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden separar por escisión de la proteína intacta, por ej., por escisión química o por proteasa.

[0175] El término «internalización» tal como se lo usa en la presente en referencia a un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno se refiere a un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que es capaz de pasar a través de la membrana bicapa lipídica de la célula a un compartimiento interno (es decir, «internalizar») al unirse con la célula, de

preferencia en un compartimiento degradativo en la célula. Por ejemplo un anticuerpo anti–HER2 de internalización es el que es capaz de entrar en la célula después de unirse a HER2 en la membrana celular. En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que se una en los ADC que se divulgan en la presente están dirigidos al antígeno de superficie de la célula (por ej., HER2) y es un fragmento de unión a anticuerpo de internalización o un fragmento de unión a antígeno de internalización (es decir, el ADC se transfiere a través de la membrana celular después de la unión al antígeno). En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno de internalización se une al receptor en la superficie de la célula. Un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno de internalización que se dirige al receptor en la membrana de la célula puede inducir una endocitosis mediada por receptor. En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno de internalización se lleva dentro de la célula por endocitosis mediada por receptor.

[0176] El término «no internalización», tal como se lo usa en la presente en referencia a un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno, se refiere a un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno que permanece en la superficie de la célula al unirse con la célula. En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno que se usa en los ADC que se divulgan en la presente se dirigen aun antígeno de superficie de la célula y es un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno de no internalización (es decir, el ADC permanece en la superficie de la célula y no se transfiere a través de la membrana celular después de la unión a antígeno). En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno de no internalización se une al receptor de no internalización u otro antígeno en la superficie de la célula. Los ejemplos de antígenos de superficie celular de no internalización incluyen, antígeno, CA125 y CEA, y los anticuerpos que se unen a objetivos antígeno de no internalización también son conocidos en el arte (ver, por ej., Bast et al. (1981) J Clin Invest. 68(5):1331–7; Scholler y Urban (2007) Biomark Med. 1(4):513–23; y Boudousq et al. (2013) PLoS One 8(7):e69613).

[0177] Los términos «receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano», «HER2» o «HER2/NEU», tal como se los usa en la presente, se refieren a cualquier forma nativa del HER2 humano. El término incluye HER2 de longitud total (por ej., Secuencia de referencia UniProt: P04626; SEQ ID NO:31), así también como cualquier forma de HER2 humana que pueda ser resultado de procesos celulares. El término también incluye variantes funcionales o fragmentos de HER2 humano que incluyen, a título enunciativo y no taxativo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de HER2 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la

proteína de tipo salvaje únicamente). HER2 se puede aislar de humanos o se puede producir por métodos recombinantes o sintéticos.

[0178] El término «anticuerpo anti–HER2» o «anticuerpo de unión a HER2» se refiere a cualquier forma de anticuerpo o sus fragmentos que se unen, por ejemplo, de forma específica, a HER2, e incluye anticuerpos monoclonales (incluso anticuerpos monoclonales de longitud total), anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpo con función biológica siempre que presenten unión, por ejemplo unión específica, a HER2. La patente estadounidense No. 5.821.337 provee ejemplos de secuencias de unión a HER2, incluso ejemplos de secuencias de anticuerpos anti–HER2, y se incorpora a la presente por referencia. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 que se usa en los ADC que se divulgan en la presente es un anticuerpo de internalización o un fragmento de anticuerpo de internalización. Trastuzumab (patente de EE. UU. Nro. 5.821.337; Molina et al. (2001) Cancer Res. 61(12):4744–9) es un ejemplo de anticuerpo anti–HER2 humano.

[0179] Los términos «sindecano–1», «SDC1», o «CD138», tal como se los usa en la presente, se refieren a cualquier forma nativa de CD138 humano. El término incluye CD138 de longitud total (por ej., Secuencia de referencia UniProt: P18827; SEQ ID NO:32), así también como cualquier forma de CD138 humana que pueda ser resultado de procesos celulares. El término también incluye variantes funcionales o fragmentos de CD138 humano, que incluyen, a título enunciativo y no taxativo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de CD138 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). CD138 se puede aislar de humanos o se puede producir por métodos recombinantes o sintéticos.

[0180] El término «anticuerpo anti–CD138» o «anticuerpo de unión a CD138» se refiere a cualquier forma de anticuerpo o sus fragmentos que se unen, por ejemplo se unen de forma específica, a CD138, e incluye anticuerpos monoclonales (incluso anticuerpos monoclonales de longitud total), anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpo con función biológica siempre que presenten unión, por ejemplo unión específica, a CD138. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 que se usa en los ADC que se divulgan en la presente es un anticuerpo de internalización o un fragmento de anticuerpo de internalización. B–B4 (Tassone et al. (2004) Blood 104:3688–96) es un ejemplo de anticuerpo anti–CD138 humano.

[0181] Los términos «receptor 2 de tipo efrina A» «EPHA2», tal como se los usa en la presente, se refieren a cualquier forma nativa de EPHA2 humano. El término incluye EPHA2 de longitud total (por ej., Secuencia de referencia UniProt: P29317; SEQ ID NO:33), así también como cualquier forma de EPHA2 humana que pueda ser resultado de

procesos celulares. El término también incluye variantes funcionales o fragmentos de EPHA2 humano, que incluyen, a título enunciativo y no taxativo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de EPHA2 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). EPHA2 se puede aislar de humanos o se puede producir por métodos recombinantes o sintéticos.

[0182] El término «anticuerpo anti–EPHA2» o «anticuerpo de unión a EPHA2» se refiere a cualquier forma de anticuerpo o sus fragmentos que se unen, por ejemplo se unen de forma específica, a EPHA2, e incluye anticuerpos monoclonales (incluso anticuerpos monoclonales de longitud total), anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpo con función biológica siempre que presenten unión, por ejemplo unión específica, a EPHA2. WO 2007/030642 proporciona y se incorpora a la presente por referencia para los ejemplos de secuencias de unión a EPHA2, incluyendo ejemplos de secuencias de anticuerpos anti–EPHA2. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 que se usa en los ADC que se divulgan en la presente es un anticuerpo de internalización o un fragmento de anticuerpo de internalización. 1C1 (WO 2007/030642; Jackson et al. (2008) Cancer Res. 68(22): 9367–74) es un ejemplo de anticuerpo anti–EPHA2 humano.

[0183] El término "mesotelina" o "MSLN", tal como se usa en este documento, se refiere a cualquier forma nativa de MSLN humana. El término abarca MSLN de longitud completa (por ejemplo, la secuencia de referencia UniProt: Q13421; SEQ ID NO: 43), así como cualquier forma de MSLN humana que pueda resultar del procesamiento celular. El término también abarca variantes o fragmentos funcionales de MSLN humana, que incluyen, entre otras, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que retienen una o más funciones biológicas de la MSLN humana (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se utiliza para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). La MSLN puede aislarse de un humano, o puede producirse de forma recombinante o por métodos sintéticos.

[0184] El término "anticuerpo anti–MSLN" o "anticuerpo que se une a MSLN" se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a MSLN, y abarca anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales, siempre que se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a MSLN. El documento WO 2011/074621 proporciona y se incorpora aquí por referencia para secuencias de unión a MSLN ejemplares, que incluyen secuencias

de anticuerpos anti–MSLN ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–MSLN usado en los ADC divulgados en este documento es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante. 11–25, IC14–30, IC7–4, IC17–35 y 2–9 son ejemplos de anticuerpos anti–MSLN humanos.

[0185] El término "glutamato carboxipeptidasa 2" o "FOLH1", tal como se usa en este documento, se refiere a cualquier forma nativa de FOLH1 humana. El término abarca FOLH1 de longitud completa (por ejemplo, la secuencia de referencia UniProt: Q04609; SEQ ID NO: 44), así como cualquier forma de FOLH1 humana que pueda resultar del procesamiento celular. El término también abarca variantes o fragmentos funcionales de FOLH1 humana, que incluyen, entre otros, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que retienen una o más funciones biológicas de FOLH1 humana (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se utiliza para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). FOLH1 puede aislarse de un humano, o puede producirse de forma recombinante o por métodos sintéticos.

[0186] El término "anticuerpo anti–FOLH1" o “anticuerpo que se une a FOLH1” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a FOLH1, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a FOLH1. WO 2019/012260 y WO 2017/212250 proporcionan y se incorporan a la presente por referencia para secuencias de unión a FOLH1 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–FOLH1 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–FOLH1 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante. J591 (desinmunizado) es un ejemplo de anticuerpo anti–humano FOLH1.

[0187] El término “caderina 6” o “CDH6”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de human CDH6. El término comprende CDH6 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: P55285; SEQ ID NO:45), así como cualquier forma de CDH6 humano que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de CDH6 humano, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de CDH6 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). CDH6 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0188] El término "anticuerpo anti–CDH6" o “anticuerpo que se une a CDH6” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a CDH6, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a CDH6. WO 2018/185618 proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a CDH6 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–CDH6 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CDH6 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0189] El término “molécula 5 de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembriónico” o “CEACAM5”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de CEACAM5 humana. El término comprende CEACAM5 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: P06731; SEQ ID NO:46), así como cualquier forma de CEACAM5 humana que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de CEACAM5 humana, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de CEACAM5 humana (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). CEACAM5 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0190] El término "anticuerpo anti–CEACAM5" o “anticuerpo que se une a CEACAM5” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a CEACAM5, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a CEACAM5. US 2015/0125386 proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a CEACAM5 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–CEACAM5 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CEACAM5 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante. hMN14 es un ejemplo de anticuerpo anti–humano CEACAM5.

[0191] El término “proteína de la familia críptica 1B” o “CFC1B”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de CFC1B humana. El término comprende CFC1B de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: P0CG36; SEQ

ID NO:47), así como cualquier forma de CFC1B humana que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de CFC1B humana, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de CFC1B humana (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). CFC1B puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0192] El término "anticuerpo anti–CFC1B" o “anticuerpo que se une a CFC1B” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a CFC1B, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a CFC1B. WO 2002/088170 proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a CFC1B ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–CFC1B ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CFC1B usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0193] El término “miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa” o “ENPP3”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de ENPP3 humano. El término comprende ENPP3 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: O14638; SEQ ID NO:48), así como cualquier forma de ENPP3 humano que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de ENPP3 humano, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de ENPP3 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). ENPP3 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0194] El término "anticuerpo anti–ENPP3" o “anticuerpo que se une a ENPP3” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a ENPP3, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a ENPP3. Donate *et al.* ((2016) Clin Cancer Res. 22(8):1989–99) proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a ENPP3

ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–ENPP3 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–ENPP3 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0195] El término “receptor de folato alfa” o “FOLR1”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de FOLR1 humano. El término comprende FOLR1 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: P15328; SEQ ID NO:49), así como cualquier forma de FOLR1 humano que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de FOLR1 humano, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de FOLR1 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). FOLR1 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0196] El término "anticuerpo anti–FOLR1" o “anticuerpo que se une a FOLR1” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a FOLR1, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a FOLR1. WO 2005/080431 y Coney *et al.* ((1991) Cancer Res. 51(22):6125–32) proporcionan y se incorporan a la presente por referencia para secuencias de unión a FOLR1 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–FOLR1 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–FOLR1 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante. Farletuzumab y MOv19 son ejemplos de anticuerpos anti–humano FOLR1.

[0197] El término “receptor celular 1 del virus de hepatitis A” o “HAVCR1”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de HAVCR1 humano. El término comprende HAVCR1 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: Q96D42; SEQ ID NO:50), así como cualquier forma de HAVCR1 humano que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de HAVCR1 humano, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de HAVCR1 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). HAVCR1 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera

recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0198] El término "anticuerpo anti–HAVCR1" o “anticuerpo que se une a HAVCR1” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a HAVCR1, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a HAVCR1. Thomas *et al.* ((2016) Mol Cancer Ther. 15(12):2946–54) proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a HAVCR1 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–HAVCR1 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HAVCR1 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0199] El término “Kit receptor del factor de crecimiento de células mast/madre” o “KIT”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de KIT humano. El término comprende KIT de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: P10721; SEQ ID NO:51), así como cualquier forma de KIT humano que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de human KIT, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de KIT humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). KIT puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0200] El término "anticuerpo anti–KIT" o “anticuerpo que se une a KIT” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a KIT, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a KIT. Shi *et al.* ((2016) Proc Natl Acad Sci USA 113(33):E4784–93) y Abrams *et al.* ((2018) Clin Cancer Res. 24(17):4297–308) proporcionan y se incorporan a la presente por referencia para secuencias de unión a KIT ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–KIT ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–KIT usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0201] El término “receptor del factor de crecimiento de hepatocitos” o “MET,” tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de MET humano. El término comprende MET de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia

UniProt: P08581; SEQ ID NO:52), así como cualquier forma de MET humano que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de MET humano, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de MET humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). MET puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0202] El término "anticuerpo anti–MET" o “anticuerpo que se une a MET” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a MET, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a MET. Yang *et al*. ((2019) Acta Pharmacol Sin.) proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a MET ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–MET ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–MET usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0203] El término “mucina–16” o “MUC16”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de MUC16 humana. El término comprende MUC16 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: Q8WXI7; SEQ ID NO:53), así como cualquier forma de MUC16 humana que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de MUC16 humana, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de MUC16 humana (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). MUC16 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0204] El término "anticuerpo anti–MUC16" o “anticuerpo que se une a MUC16” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a MUC16, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a MUC16. Liu *et al.* ((2016) Ann Oncol. 27(11):2124–30) proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a

MUC16 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–MUC16 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–MUC16 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0205] El término “transportador de zinc ZIP6” o “SLC39A6”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de SLC39A6 humano. El término comprende SLC39A6 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt:Q13433; SEQ ID NO:54), así como cualquier forma de SLC39A6 humano que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de SLC39A6 humano, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de SLC39A6 humano (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). SLC39A6 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0206] El término "anticuerpo anti–SLC39A6" o “anticuerpo que se une a SLC39A6” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a SLC39A6, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a SLC39A6. Sussman *et al.* ((2014) Mol Cancer Ther. 13(12):2991–3000) proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a SLC39A6 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–SLC39A6 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–SLC39A6 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0207] El término “proteína 4 tipo transportador de colina” o “SLC44A4”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de SLC44A4 humana. El término comprende SLC44A4 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: Q53GD3; SEQ ID NO:55), así como cualquier forma de SLC44A4 humana que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de SLC44A4 humana, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de SLC44A4 humana (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). SLC44A4 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0208] El término "anticuerpo anti–SLC44A4" o “anticuerpo que se une a SLC44A4”

se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a SLC44A4, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a SLC44A4. Mattie *et al.* ((2016) Mol Cancer Ther. 15(11):2679–87) proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a SLC44A4 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–SLC44A4 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–SLC44A4 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0209] El término “metalorreductasa STEAP1” o “STEAP1”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de STEAP1 humana. El término comprende STEAP1 de longitud completa (por ejemplo, Secuencia de Referencia UniProt: Q9UHE8; SEQ ID NO:56), así como cualquier forma de STEAP1 humana que puede resultar del procesamiento celular. El término también comprende variantes o fragmentos funcionales de STEAP1 humana, incluyendo, pero sin limitaciones, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas que conservan una o más funciones biológicas de STEAP1 humana (es decir, las variantes y los fragmentos están comprendidos a menos que el contexto indique que el término se usa para referirse a la proteína de tipo salvaje únicamente). STEAP1 puede aislarse de un humano, o puede producirse de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

[0210] El término "anticuerpo anti–STEAP1" o “anticuerpo que se une a STEAP1” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a STEAP1, y comprende anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales en tanto se unan, por ejemplo, se unan específicamente, a STEAP1. WO 2008/052187 proporciona y se incorpora a la presente por referencia para secuencias de unión a STEAP1 ejemplares, incluyendo secuencias de anticuerpos anti–STEAP1 ejemplares. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–STEAP1 usado en los ADC divulgados en la presente es un anticuerpo internalizante o fragmento de anticuerpo internalizante.

[0211] Tal como se los usa en la presente, los términos «específico», «unión específica» y «de forma específica» se refieren a una reacción de unión entre un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno (por ej., un anticuerpo anti–HER2) y un antígeno objetivo (por ej., HER2) en una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Se puede probar la especificidad de unión de los anticuerpos para unirse al comparar la unión a un antígeno apropiado y la unión a un antígeno irrelevante o una

mezcla de antígenos en un conjunto de condiciones establecidas. Si el anticuerpo se une al antígeno apropiado con al menos 2, 5, 7, y de preferencia 10 o más veces mayor afinidad que al antígeno irrelevante o a la mezcla de antígenos, entonces se considera que es específico. Un «anticuerpo específico» o un «anticuerpo específico para el objetivo» es el que solo se une al antígeno objetivo (por ej., HER2), pero no se une (o exhibe unión mínima) a otros antígenos. En ciertas formas de realización, un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno con unión específica al antígeno objetivo (por ej., HER2) tiene una K_D de menos de $1x10^{-6}$ M, menos de $1x10^{-7}$ M, menos de $1x10^{-8}$ M, menos de $1x10^{-9}$ M, menos de $1x10^{-10}$ M, menos de $1x10^{-11}$ M, menos de $1x10^{-12}$ M, o menos de $1x10^{-13}$ M. En ciertas formas de realización, la K_D es de entre 1 pM y 500 pM. En algunas formas de realización, la K_D es entre 500 pM y 1 µM, entre 1 µM y 100 nM, o entre 100 mM y 10 nM.

[0212] El término «epítopo» se refiere un la parte de un antígeno capaz de que un anticuerpo lo reconozca y se una de forma específica. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por pliegues terciarios del polipéptido. El epítopo que se une a un anticuerpo se puede identificar con cualquier técnica de mapeo de epítopos conocida en el arte, que incluye cristalografía de rayos X para identificación de epítopos mediante visualización directa del complejo antígeno–anticuerpo, así como también monitorear la unión del anticuerpo a los fragmentos o las variaciones mutadas del antígeno, o monitorear la accesibilidad al solvente de partes diferentes del anticuerpo y del antígeno. Los ejemplos de estrategias que se usan para mapear epítopos de anticuerpos incluyen, a título enunciativo y no taxativo, escaneo de oligopéptidos basado en matrices, proteólisis limitada, mutagénesis dirigida al sitio, mapeo de mutagénesis de alto rendimiento, intercambio hidrógeno–deuterio, y espectrometría de masas (ver, por ej., Gershoni et al. (2007) 21:145–56; y Hager–Braun y Tomer (2005) Expert Rev Proteomics 2:745–56).

[0213] También se puede usar la unión competitiva y la unión a epítopo para determinar anticuerpos que comparten epítopos idénticos o superpuestos. La unión competitiva se puede evaluar mediante un ensayo de bloqueo cruzado, tal como el ensayo que se describe en “Antibodies, A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow y Lane (1st edition 1988, 2nd edition 2014). En algunas formas de realización, la unión competitiva se identifica cuando un anticuerpo de prueba o una proteína de unión reduce la unión a un anticuerpo de referencia o una proteína de unión a un antígeno de referencia tal como HER2 (por ej., una proteína de unión que comprende CDR y/o dominios variables seleccionados entre aquellos que se identifican en las Tablas 2 a 4), por al menos aproximadamente 50% en el ensayo de bloqueo cruzado (por ej., 50%,

60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99.5%, o más, o cualquier porcentaje intermedio), y/o viceversa. En algunas formas de realización, la unión competitiva se puede deber a epítopos compartidos o similares (por ej., con superposición parcial), o a un impedimento estérico en el que los anticuerpos o las proteínas de unión se unen a epítopos cercanos (ver, por ej., Tzartos, Methods in Molecular Biology (Morris, ed. (1998) vol. 66, pp. 55–66)). En algunas formas de realización, la unión competitiva se puede usar para clasificar grupos de proteínas de unión que comparten epítopos similares. Por ejemplo, las proteínas de unión que compiten por la unión se pueden «ubicar» en un grupo de proteínas de unión que tienen epítopos superpuestos o cercanos, mientras que las que no compiten se ubican en un grupo independiente de proteínas de unión que no tienen epítopos superpuestos ni cercanos.

[0214] Los términos «k_{on}» o «k_a» se refieren a la constante de afinidad de asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo–antígeno. La tasa se puede determinar con ensayos estándar, tales como resonancia de plasmón superficial, interferometría de biocapa o ensayo ELISA.

[0215] Los términos «k_{off}» o «k_d» se refieren a la constante de disociación de un anticuerpo al antígeno del complejo anticuerpo–antígeno. La tasa se puede determinar con ensayos estándar, tales como resonancia de plasmón superficial, interferometría de biocapa o ensayo ELISA.

[0216] El término «K_D» se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo–antígeno en particular. La K_D se calcula por k_a/k_d. La tasa se puede determinar con ensayos estándar, tales como resonancia de plasmón superficial, interferometría de biocapa o ensayo ELISA.

[0217] El término «*p*» o «carga de fármaco» o «relación fármaco:anticuerpo» o «relación fármaco–a–anticuerpo» o «DAR» (por su sigla en inglés) se refiere al número de restos de fármaco por fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno, es decir, la carga de fármaco, o el número de restos –L–D por fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno (Ab) en los ADC de Fórmula (I). En los ADC que comprenden un resto de fármaco modulador de empalme, «*p*» se refiere al número de compuestos moduladores de empalme enlazados al anticuerpo o al fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, si dos compuestos moduladores de empalme (por ej., dos compuestos que cada uno tiene la estructura de D1) se unen a un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno, $p = 2$. En las composiciones que comprenden varias copias de los ADC de Fórmula (I), el «*p* promedio» se refiere al número promedio de restos –L–D por fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno, también conocido como «carga promedio de fármaco».

[0218] Un «enlazador» o un «resto enlazador» se usa en la presente para hacer

referencia a cualquier resto químico capaz de unirse a un compuesto por unión covalente, en general un resto de fármaco tal como un resto de fármaco modulador de empalme, a cualquier otro resto tal como un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno. Los enlazadores pueden ser susceptibles a la escisión inducida por ácido, escisión inducida por peptidasa, escisión basada en la luz, escisión inducida por esterasa, y/o escisión de unión disulfuro o resistentes en gran medida a todas ellas, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanecen activos.

[0219] El término «agente» se usa en la presente para referirse a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto obtenido de materiales biológicos. Los términos «agente terapéutico» o «fármaco» se refiere a un agente que es capaz de modular un proceso biológico y/o presenta actividad biológica. Los compuestos moduladores de empalme que se describen en la presente son ejemplos de agentes terapéuticos.

[0220] Los términos «agente quimioterapéutico» o «agente anticáncer» se usan en la presente para referirse a todos los agentes que son eficaces para tratar el cáncer, sin tener en cuenta el mecanismo de acción. La inhibición de la metástasis o la angiogénesis es con frecuencia una propiedad del agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos incluyen anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas, y abarcan los compuestos moduladores de empalme que se describen en la presente. Un agente quimioterapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. El término «agente citostático» se refiere a un agente que inhibe o suprime el crecimiento celular y/o la multiplicación de las células. El término «agente citotóxico» se refiere a una sustancia que causa la muerte celular en primer lugar al interferir con la actividad de expresión de una célula y/o su funcionamiento.

[0221] Tal como se los usa en la presente, los términos «modulador de empalme», «modulador de espliceosoma» se refieren a los compuestos que tienen actividad anticáncer al interactuar con componentes del espliceosoma. En algunas formas de realización, un modulador de empalme altera el índice o la forma del empalme en una célula objetivo. Los moduladores de empalme que funcionan como agentes inhibidores, por ejemplo, son capaces de disminuir la proliferación celular descontrolada. En algunas formas de realización, los moduladores de empalme pueden actuar la unirse al complejo de espliceosoma SF3b. Dichos moduladores pueden ser compuestos naturales o compuestos sintéticos. Los ejemplos no taxativos de los moduladores de empalme y categorías de dichos moduladores incluyen pladienolida (por ej., pladienolida D o pladienolida B), derivados de pladienolida (por ej., derivados pladienolida D o pladienolida B), herboxidieno, derivados de herboxidieno, espliceostatina, derivados de

espliceostatina, sudemicina, o derivados de sudemicina. Ta como se los usa en la presente, los términos «derivado» y «análogo» cuando se refieren a un modulador de empalme, o similares, significan cualquier compuesto que retiene en esencia la misma función biológica o actividad, o similar o mejorada, que el compuesto original, pero tiene una estructura química o biológica alterada. En algunas formas de realización, el modulador de empalme es una pladienolida o un derivado de la pladienolida.

[0222] Tal como se lo usa en la presente, un «derivado de la pladienolida» se refiere a un compuesto que tiene una relación estructural con un miembro de la familia de los productos naturales conocidos como pladienolidas y que retiene una o más funciones biológicas del compuesto de inicio. Las pladienolidas se identificaron por primera vez en la bacteria *Streptomyces platensis* (Mizui et al. (2004) J Antibiot. 57:188–96) como sustancia con gran potencia citotóxica y que da como resultado la detención del ciclo celular en las fases G1 y G2/M del ciclo celular (por ej., Bonnal et al. (2012) Nat Rev Drug Dis 11:847–59). Existen siete pladienolidas que ocurren de forma natural, pladienolidas A a G (Mizui et al. (2004) J Antibiot. 57:188–96; Sakai et al. (2004) J Antibiotics 57:180–7). En las patentes estadounidenses No. 7.884.128 y 7.816.401 se describen ejemplos de métodos para sintetizar pladienolida B y D y cada uno se incorpora a la presente por referencia a dichos métodos. La síntesis de pladienolida B y D también se puede realizar con los ejemplos de métodos que se describen en Kanada et al. ((2007) Angew Chem Int Ed. 46:4350–5). Kanada et al. y en la publicación internacional No. WO 2003/099813 se describen ejemplos de métodos para sintetizar E7107 (D11) (Compuesto 45 de WO 2003/099813) de Pladienolida D (11107D de WO 2003/099813). Una patente estadounidense correspondiente es la No. 7.550.503 a Kotake et al. Cada una de estas referencias se incorpora a la presente por referencia a los métodos de síntesis que se describen en ellas.

[0223] Tal como se lo usa en la presente, un «resto de fármaco modulador de empalme» se refiere al componente de un ADC o composición que provee la estructura de un compuesto modulador de empalme, por ej., el componente modulador de empalme (D) en un ADC de Fórmula (I), o en una composición que comprende –L–D.

[0224] Tal como se lo usa en la presente, un «espliceosoma» se refiere a un complejo de ribonucleoproteínas que elimina intrones de uno o más segmentos de ARN, tal como segmentos ARNm.

[0225] El término «homólogo» se refiere a una molécula que exhibe homología con otra molécula, por ejemplo, por tener secuencias de residuos químicos que son iguales o similares a las posiciones correspondientes.

[0226] Los términos «inhibir» o «inhibición», tal como se los usa en la presente,

significan reducir en una cantidad mensurable y que puede incluir, pero no exige, prevención o inhibición completa.

[0227] Los términos «negativo para el objetivo», «negativo para el antígeno objetivo» o «negativo para el antígeno» se refieren a la ausencia de expresión del antígeno objetivo para una célula o un tejido. Los términos «positivo para el objetivo», «positivo para el antígeno objetivo» o «positivo para el antígeno» se refieren a la presencia de expresión del antígeno objetivo. Por ejemplo, una célula o línea de células que no expresan un antígeno objetivo se pueden describir como negativas para el objetivo, mientras que una célula o línea e células que expresan el antígeno objetivo se pueden describir como positivas para el objetivo.

[0228] Los términos «muerte del tercero» o «efecto del tercero» se refieren a la muerte de células negativas para el objetivo en presencia de células positivas para el objetivo, donde la muerte de las células negativas para el objetivo no se observa en ausencia de células positivas para el objetivo. El contacto de célula a célula, o al menos la proximidad entre células positivas para el objetivo y negativas para el objetivo, permite la muerte del tercero. Este tipo de muerte se puede diferenciar de la «muerte fuera del objetivo», que se refiere a la muerte indiscriminada de células negativas para el objetivo. La «muerte fuera del objetivo» se puede observar en ausencia de células positivas para el objetivo.

[0229] Los términos «trastorno neoplásico» y «cáncer» se usan en la presente de manera indistinta para referirse a la presencia de células que presentan características típicas de células que causan cáncer, tales como proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, índice de crecimiento y proliferación rápido, y/o ciertos rasgos morfológicos. A menudo, las células cancerosas se pueden presentar en forma de un tumor o masa, pero tales células pueden existir solas dentro de un sujeto, o pueden circular en el flujo sanguíneo como células independientes, tales como células de leucemia o linfoma. Los términos «trastorno neoplásico» y «cáncer» incluyen todos los tipos de cáncer y metástasis de cáncer, incluso enfermedades malignas hematológicas, tumores sólidos, sarcomas, carcinomas y otros cánceres de tumores sólidos y no sólidos. Las enfermedades malignas hematológicas pueden incluir enfermedades malignas de las células B, cáncer de la sangre (leucemia), cáncer de células plasmáticas (mielomas, por ej., mieloma múltiple), o cáncer de los ganglios linfáticos (linfomas). Los ejemplos de enfermedades malignas de las células B incluyen leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma folicular, linfoma de células del manto y linfoma difuso de células B grandes. Las leucemias pueden incluir leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia

mielomonocítica crónica (CMML), leucemia monocítica aguda (AMoL), etc. Los linfomas pueden incluir el linfoma de Hodgkin y los linfomas no Hodgkin. Otras enfermedades hematológicas pueden incluir síndrome mielodisplásico (MDS). Los tumores sólidos pueden incluir carcinomas tales como adenocarcinoma, por ej., cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon o colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cérvix, cáncer de endometrio, cáncer de ovarios, colangiocarcinoma, glioma, melanoma, etc.

[0230] Los términos «tumor» y «neoplasia» se refieren a cualquier masa de tejido que se produce por crecimiento o proliferación celular excesiva, ya sea benigno o maligno, que incluye lesiones precancerosas.

[0231] Los términos «célula tumoral» y «célula neoplásica» se usan de manera indistinta y se refieren a células individuales o la población total de células derivadas de un tumor o una neoplasia, que incluyen tanto células no tumorigénicas y células madre cancerígenas. Tal como se lo usa en la presente, el término «célula tumoral» se puede modificar con el término «no tumorigénica» cuando se refiere solo a aquellas células tumorales que no presentan capacidad para renovar ni diferenciarse para distinguir dichas células tumorales de las células madre cancerígenas.

[0232] Los términos «sujeto» y «paciente» se usan de manera indistinta en la presente para referirse a cualquier animal, tal como un mamífero, que incluye, a título enunciativo y no taxativo, humanos, primates no humanos, roedores, y similares. En algunas formas de realización, el mamífero es un ratón. En algunas formas de realización, el mamífero es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón. En algunas formas de realización, el sujeto es un humano.

[0233] El término «coadministración» o administración «en combinación con» uno o más agentes terapéuticos incluye la administración concurrente y la administración consecutiva en cualquier orden.

[0234] Una «composición farmacéutica» se refiere a una preparación que se encuentra en forma tal de permitir la administración y luego proveer la actividad biológica prevista del ingrediente activo y/o lograr un efecto terapéutico, y que no contiene componentes adicionales que tengan una toxicidad inaceptable para un sujeto a quien se le administrará la formulación. La composición farmacéutica puede ser estéril

[0235] Un «excipiente farmacéutico» comprende un material tal como un adyuvante, un portador, un agente de ajuste de pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, agentes preservantes y similares.

[0236] «Farmacéuticamente aceptable» significa aprobado o en vías de aprobación por parte de una agencia regulatoria del estado nacional o provincial, o mencionada en la

Farmacopea de los Estados Unidos, u otra farmacopea reconocida en general, para uso en animales y, en especial, en humanos.

[0237] Una «sal farmacéuticamente aceptable» es una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no imparte efectos toxicológicos no deseados. Los ejemplos de tales sales son los siguientes: (a) sales por adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; y sales formadas con ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalensulfónico, ácido metansulfónico, ácido p–toluensulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; y (b) sales formadas de aniones elementales tales como cloro, bromo e iodo. *Ver*, *por ej.*, Haynes et al. «Commentary: Occurrence of Pharmaceutically Acceptable Anions and Cations in the Cambridge Structural Database», J Pharmaceutical Sciences, vol. 94, no. 10 (2005), y Berge et al. «Pharmaceutical Salts», J Pharmaceutical Sciences, vol. 66, no. 1 (1977), que se Incorporan a la presente por referencia.

[0238] El término «cantidad eficaz», tal como se lo usa en la presente, se refiere a la cantidad de un compuesto, ADC, o composición que se describen en la presente (por ej., un modulador de empalme o un ADC) que es suficiente para realizar un propósito establecido específico, por ejemplo, producir un efecto terapéutico después de la administración, tal como la reducción del índice de crecimiento del tumor o del volumen del tumor, una reducción en los síntomas del cáncer o cualquier otro indicio de eficacia del tratamiento. Una cantidad eficaz se puede determinar de manera rutinaria en relación con el propósito establecido. El término «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad de un compuesto, un ADC, o una composición que se describen en la presente que es eficaz en muerte, reducción y/o inhibición detectable del crecimiento o la expansión de células tumorales, el tamaño o cantidad de tumores y/u otra medición de nivel, estadio, progresión y/o gravedad del cáncer. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según la aplicación prevista (in vitro o in vivo), o el sujeto y el estado de la enfermedad que se trata, por ej., el peso y la edad del sujeto, la gravedad del estado de la enfermedad, la forma de administración y similares, que cualquier experto en el arte puede determinar con facilidad. El término también se aplica a una dosis que induce una respuesta específica en células objetivo, por ej., la inhibición del crecimiento celular. La dosis específica puede variar según, por ejemplo, la composición farmacéutica específica, el sujeto y su edad y el estado de salud existente o riesgos de estado de salud, el régimen

de dosificación que se debe seguir, la gravedad de la enfermedad, si se administra en combinación con otros agentes, el tiempo de la administración, el tejido en el cual se administra, y el sistema físico de entrega en el que se transporta. En el caso de cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de ADC puede reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, inhibir (por ej., demorar o detener) la metástasis tumoral, inhibir (por ej., demorar o detener) el crecimiento tumoral y/o aliviar uno o más síntomas.

[0239] Una «cantidad profilácticamente eficaz» se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Por lo general, como la dosis profiláctica se usa en sujetos antes de la enfermedad o en estadios tempranos de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0240] Tal como se lo usa en la presente, «tratar» o «terapéutico» y los términos gramáticos relacionados, se refieren a cualquier mejora que tiene consecuencia en la enfermedad, tal como prolongar la sobrevida, menor morbilidad, y/o una disminución de los efectos secundarios que son resultado de una modalidad terapéutica alternativa. Tal como se puede apreciar con facilidad en el arte, la erradicación total de la enfermedad está incluida, pero no es necesaria para el acto del tratamiento. Tal como se los usa en la presente, «tratamiento» o «tratar» se refieren a la administración de un ADC o una composición que se describe en la presente a un sujeto, por ej., un paciente. El tratamiento puede curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, atenuar, paliar, mejorar o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición al trastorno, por ej., un cáncer. En algunas formas de realización, además de tratar a un sujeto con una afección, se puede proveer además una composición que se describe en la presente para prevenir o reducir las posibilidades de desarrollar dicha afección.

[0241] En algunas formas de realización, se usa un ADC marcado. Los «marcadores» aptos incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares.

[0242] Por «proteína», tal como se lo usa en la presente, se entiende al menos dos aminoácidos enlazados por unión covalente. El término incluye polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. En algunas formas de realización, los dos o más aminoácidos enlazados por unión covalente están enlazados por una unión peptídica. La proteína se puede obtener de aminoácidos de ocurrencia natural y uniones peptídicas, por ejemplo, cuando la proteína se obtiene por recombinación al usar los sistemas de expresión y las células huésped. Como alternativa, la proteína puede incluir aminoácidos sintéticos (por ej., homofenilalanina, citrulina, ornitina, y norleucina), o estructuras peptidomiméticas, es decir, «péptidos o análogos de proteínas», tales como peptoides. Los peptoides son un

ejemplo de clase de peptidomiméticos cuyas cadenas laterales se anexan al átomo de nitrógeno de la columna de péptido en vez de a los carbonos α (ya que están en aminoácidos), y tienen uniones de hidrógeno y características de conformación diferentes en comparación con los péptidos (ver, por ej., Simon et al. (1992) Proc Natl Acad Sci. USA 89:9367). Como tales, los peptoides pueden ser resistentes a la proteólisis u otras condiciones fisiológicas o de almacenamiento y son efectivos para penetrar membranas celulares. Tales aminoácidos sintéticos se pueden incorporar en especial cuando el anticuerpo se sintetiza in vitro por métodos convencionales bien conocidos en el arte. Además, se puede usar cualquier combinación de restos o estructuras de peptidomiméticos, sintéticos y residuos de ocurrencia natural. Los «aminoácidos» también incluyen residuos imino, tales como prolina e hidroxiprolina. El aminoácido del «grupo R» o la «cadena lateral» puede tener una configuración ya sea (L)– o (S)–. En una forma de realización específica, los aminoácidos están en configuración (L)– o (S)–.

[0243] Una «proteína recombinante» es una proteína obtenida con técnicas recombinantes que usa cualquier técnica y método conocidos en el arte, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante. Los métodos para la preparación de las proteínas recombinantes son conocidos en el arte.

[0244] Una proteína «aislada» no está acompañada de al menos algo del material con el cual se la asocia normalmente en el estado natural, por ejemplo, constituye al menos aproximadamente un 5%, o al menos aproximadamente un 50% en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir entre el 5% y el 99.9% en peso del contenido total de la proteína según sean las circunstancias. Por ejemplo, la proteína se puede obtener en una concentración significativamente más alta con el uso de un promotor inducible o un promotor de expresión elevada, de manera tal que la proteína se obtiene en niveles de concentración aumentados. La definición incluye la producción de un anticuerpo en una gran variedad de organismos y/o células huésped que son conocidas en el arte.

[0245] Para las secuencias de aminoácido, la identidad y/o la similitud de la secuencia se puede determinar con técnicas estándar conocidas en el arte que incluyen, a título enunciativo y no taxativo, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Aguaman (1981) Adv Appl Math. 2:482, el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch (1970) J Mol Biol. 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc Nat Acad Sci. USA 85:2444, implementaciones comutarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al. (1984) Nucl Acid Res.

12:387–95, de preferencia con la configuración predeterminada, o por inspección. De preferencia, la identidad porcentual se calcula con FastDB sobre la base de los siguientes parámetros: penalización de 1 por divergente; penalización de 1 por brecha; penalización de 0.33 por tamaño de brecha; y penalización de 30 por unión ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127–149 (1988), Alan R. Liss, Inc.).

[0246] Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas mediante alineaciones progresivas en pares. También puede trazar un árbol para mostrar la agrupación de vínculos que usó para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresivo de Feng & Doolittle (1987) J Mol Evol. 35:351–60; el método es similar al que se describe en Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5:151–3. Los parámetros útiles de PILEUP incluyen peso de brecha predeterminado de 3.00, un peso de longitud de brecha predeterminado de 0.10, y brechas de extremos ponderados.

[0247] Otro ejemplo de algoritmo útil es BLAST, que se describe en: Altschul et al. (1990) J Mol Biol. 215:403–10; Altschul et al. (1997) Nucl Acid Res. 25:3389–402; y Karin et al. (1993) Proc Natl Acad Sci. USA 90:5873–87. Un programa útil en especial de BLAST es el programa WU–BLAST–2 que se obtuvo de Altschul et al. (1996) Methods in Enzymology 266:460–80. WU–BLAST–2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales están establecidos en valores predeterminados. Los parámetros ajustables se establecen para los valores siguientes: lapso de solapamiento = l, fracción de solapamiento = 0.125, umbral de palabra (T) = II. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y los establece el propio programa según la composición de la secuencia específica y la composición de la base de datos específica contra la cual se busca la secuencia de interés; no obstante, los valores se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad.

[0248] Otro algoritmo útil adicional es gapped BLAST según informa Altschul et al. (1997) Nucl Acid Res. 25:3389–402. Gapped BLAST usa los puntajes de sustitución BLOSUM–62; el parámetro del umbral T se establece en 9; el método de dos respuestas para disparar extensiones sin brechas, carga longitudes de brecha de k a costa de 10+k; Xu se establece en 16, y Xg se establece en 40 para la etapa de búsqueda en la base de datos y en 67 para la etapa de resultados de los algoritmos. Las alineaciones con brecha se disparan con un puntaje que corresponde a aproximadamente 22 bits.

[0249] En general, la homología de aminoácidos, la similitud o la identidad entre las proteínas que se divulgan en la presente y sus variantes, incluso las variantes de los antígenos objetivo (tales como HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4 o STEAP1) y las

variantes de los dominios variables de anticuerpo (incluye las CDR variables individuales), son al menos el 80% de las secuencias que se muestran en la presente, por ej., homologías o identidades de al menos un 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, casi 100%, o 100%.

[0250] De manera similar, el «porcentaje (%) de identidad de secuencia del ácido nucleico» con respecto a la secuencia de ácido nucleico en los anticuerpos y otras proteínas que se identifican en la presente se define como el porcentaje de residuos de nucleótido en la secuencia candidato que son idénticos a los restos de nucleótido en la secuencia de codificación de la proteína de unión a antígeno. Un método específico usa el módulo BLASTN de WU–BLAST–2 establecido en los parámetros predeterminados, con un lapso de solapamiento y una fracción de solapamiento establecidos en 1 y 0.125, respectivamente.

[0251] Mientras el sitio o la región para introducir una variación de secuencia de aminoácido es predeterminada, la mutación en sí no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, a fin de optimizar el desempeño de una mutación en un sitio dado, se puede conducir una mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo y se pueden analizar las variantes de CDR de la proteína de unión a antígeno para lograr la combinación óptima. Las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados de ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidos, por ejemplo, mutagénesis del cebador MI3 y mutagénesis de PCR.

[0252] «Alquilo» o «grupo alquilo», tal como se los usa en la presente, significan un hidrocarburo de cadena lineal, ramificada o cíclica, que está totalmente saturado. En ciertas formas de realización, los grupos alquilo pueden contener entre 1 y 8 átomos de carbono («C_1–C_8alquilo»). En ciertas formas de realización, los grupos alquilo pueden contener entre 1 y 6 átomos de carbono («C_1–C_6alquilo»). En ciertas formas de realización, los grupos alquilo pueden contener entre 1 y 3 átomos de carbono. En incluso otras formas de realización, los grupos alquilo contienen entre 2 y 3 átomos de carbono, y en incluso otras formas de realización los grupos alquilo contienen entre 1 y 2 átomos de carbono.

[0253] Tal como se lo usa en la presente, «alquilalcoxi» significa un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi. Tal como se lo usa en la presente, «alcoxi» se refiere a un grupo alquilo, tal como se lo definió en lo que precede, enlazado a la cadena de carbono principal a través de un átomo de oxígeno («alcoxi»).

[0254] Tal como se lo usa en la presente, «alquilamino» significa un grupo alquilo sustituido con un grupo amino. Tal como se lo usa en la presente, «amino» se refiere a –NH_2, –NH(alquilo), o –N(alquil)(alquilo).

[0255] Tal como se lo usa en la presente, «hidroxialquilo» significa un grupo alquilo sustituido con un grupo amino. Tal como se los usa en la presente, «hidroxi" o «hidroxilo» se refieren a –OH.

[0256] «Alquileno» se refiere a un radical divalente del grupo alquilo. Por ejemplo, $–CH_2–$, $–CH_2CH_2–$, $–CH_2CH_2CH_2–$, $–CH_2CH_2CH_2CH_2–$, $–CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2–$, y $–CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2–$ se refieren a metileno, etileno, n–propileno, n–butileno, n–pentileno y n–hexileno, respectivamente.

[0257] Tal como se lo usa en la presente, «carbociclo» incluye tanto grupos aromáticos (por ej., arilo) como grupos no aromáticos (por ej., cicloalquilo). En ciertas formas de realización, los grupos carbociclo contienen entre 3 y 10 átomos de carbono («carbociclo de 3 a 10 miembros»). En ciertas formas de realización, los grupos carbociclo contienen entre 3 y 8 átomos de carbono («carbociclo de 3 a 8 miembros»). En ciertas formas de realización, los grupos carbociclo contienen entre 3 y 6 átomos de carbono («carbociclo de 3 a 6 miembros»). En ciertas formas de realización, los grupos carbociclo contienen entre 3 y 5 átomos de carbono («carbociclo de 3 a 5 miembros»).

[0258] «Halógeno» se refiere a un radical de cualquier halógeno, por ej., –F, –Cl, –Br, o –I.

[0259] Tal como se los usa en la presente, los términos «heterociclo», «heterociclilo» y «heterocíclico» significan un heterociclo monocíclico, un heterociclo bicíclico, o un heterociclo tricíclico que contienen al menos un heteroátomo en el anillo.

[0260] El heterociclo monocíclico es un anillo de 3, 4, 5, 6, 7, u 8 miembros que contiene al menos un heteroátomo seleccionado independientemente entre O, N, y S. En algunas formas de realización, el heterociclo es un anillo de 3 o 4 miembros que contiene un heteroátomo seleccionado entre O, N y S. En algunas formas de realización, el heterociclo es un anillo de 5 miembros que contiene ningún o un doble enlace y uno, dos o tres heteroátomos seleccionados entre O, N y S. En algunas formas de realización, el heterociclo es un anillo de 6, 7, u 8 miembros que contienen ningún o uno o dos dobles enlaces y uno, dos o tres heteroátomos seleccionados entre O, N y S. Los ejemplos representativos de heterociclos monocíclicos incluyen, a título enunciativo y no taxativo, azetidinilo, azepanilo, aziridinilo, diazepanilo, 1,3–dioxanilo, 1,3–dioxolanilo, dihidropiranilo (incluso 3,4–dihidro–2H–piran–6–ilo), 1,3–ditiolanilo, 1,3–ditianilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolinilo, isotiazolidinilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, oxadiazolinilo, oxadiazolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, piperidinilo, piranilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo (incluso tetrahidro–2H–piran–4–ilo), tetrahidrotienilo, tiadiazolinilo, tiadiazolidinilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, tiomorfolinilo, 1,1–dioxidotiomorfolinilo

(tiomorfolinsulfona), tiopiranilo, y tritianilo.

[0261] Los heterociclos bicíclicos de la presente divulgación pueden incluir un heterociclo monocíclico fusionado a un grupo arilo, o un heterociclo monocíclico fusionado a un cicloalquilo monocíclico, o un heterociclo monocíclico fusionado a un cicloalquenilo monocíclico, o un heterociclo monocíclico fusionado a un heterociclo monocíclico que tiene un total de entre 5 y 12 átomos en el anillo. Los ejemplos de heterociclos bicíclicos incluyen, a título enunciativo y no taxativo, 3,4–dihidro–2H–piranilo, 1,3–benzodioxolilo, 1,3–benzoditiolilo, 2,3–dihidro–1,4–benzodioxinilo, 2,3–dihidro–1–benzofuranilo, 2,3–dihidro–1–benzotienilo, 2,3–dihidro–1H–indolilo, y 1,2,3,4–tetrahidroquinolinilo.

[0262] Los términos “heterociclo”, “heterociclilo” y “heterocíclico” incluyen los heteroarilos. Los «heteroarilos» se refieren a un resto cíclico que tiene uno o más anillos cerrados, con uno o más heteroátomos (oxígeno, nitrógeno o azufre) en al menos uno de los anillos, en los que al menos uno de los anillos es aromático, y donde el anillo o los anillos pueden estar fusionados y/o unidos por puente. Los ejemplos incluyen, a título enunciativo y no taxativo, fenilo, tiofenilo, triazolilo, piridinilo, pirimidinilo, piridazinilo y pirazinilo.

[0263] Tal como se describen en la presente, los compuestos de la divulgación pueden contener restos «opcionalmente sustituidos». En general, el término «sustituido», ya sea precedido por el término «opcionalmente» o no, significa que uno o más hidrógenos del resto designado se reemplazaron con un sustituyente apto. A menos que se indique lo contrario, un grupo «sustituido opcionalmente» puede tener un sustituyente apto en cada posición sustituible del grupo, y cunado más de una posición en una estructura dada se puede sustituir con más de un sustituyente seleccionado entre un grupo específico, el sustituyente puede ser el mismo en cada posición o puede ser diferente. Las combinaciones de sustituyentes previstos en la presente divulgación son de preferencia aquellos que dan como resultado la formación de compuestos estables o viables en cuanto a la química.

[0264] El experto en el arte comprenderá que «sustitución» o «sustituido por» o «ausencia» incluye la salvedad implícita de que cada sustitución o ausencia se produce de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución o la ausencia da como resultado un compuesto estable, por ej., que no sufre transformación espontánea tal como reestructuración, ciclización, eliminación, etc. A los fines de la presente divulgación, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno, y/o cualquier sustituyente permitido de compuestos orgánicos que se describen en la presente y que satisfacen las valencias de los

heteroátomos.

[0265] «Estable» se refiere a los compuestos que no tienen alteraciones químicas y/o físicas considerables cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección y, en ciertas formas de realización, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines que se divulgan en la presente. En algunas formas de realización, un compuesto estable o un compuesto químicamente viable es el que no presenta alteraciones considerables cuando se lo mantiene a una temperatura de 40 °C o menos, en ausencia de humedad u otras condiciones químicas reactivas, durante al menos una semana. En algunas formas de realización, los compuestos divulgados en la presente son estables.

[0266] Los enantiómeros que se enseñan en la presente pueden incluir isómeros «enantioméricamente puros» que comprenden en esencia un solo enantiómero, por ejemplo, mayor o igual que el 90%, 92%, 95%, 98%, o el 99%, o igual al 100% de un solo enantiómero, a un centro o centros asimétricos específicos. Un «centro asimétrico» o un «centro quiral» se refiere a un átomo de carbono tetrahédrico que comprende cuatro sustituyentes diferentes.

[0267] Los compuestos que se describen en la presente pueden contener además proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos se pueden radiomarcar con isótopos radioactivos tales como, por ejemplo, deuterio (^{2}H), tritio (^{3}H), carbono–13 (^{13}C), o carbono–14 (^{14}C). Está previsto que todas las variaciones isotópicas de los compuestos que se divulgan en la presente, sean radioactivos o no, estén incluidas en el alcance de la presente divulgación. Además, está previsto que todas las formas tautoméricas de los compuestos que se describen en la presente estén incluidas en el alcance de la divulgación reivindicada.

<u>Conjugados anticuerpo–fármaco</u>

[0268] Los compuestos conjugados anticuerpo–fármaco (ADC) de la presente divulgación incluyen aquellos con actividad anticáncer. En particular, los compuestos ADC incluyen un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno (incluso un fragmento de unión a antígeno de ellos) conjugado (es decir, enlazado por unión covalente mediante un enlazador) a un resto de fármaco (por ej., un modulador de empalme), donde el resto de fármaco, cuando no está conjugado a un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno, tiene efecto citotóxico o citostático. En varias formas de realización, el resto de fármaco, cuando no está conjugado a un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno, es capaz de unirse a un complejo de espliceosoma SF3b y/o interactuar con él. En varias formas de realización, el resto de fármaco, cuando no está conjugado a un fragmento de unión a

anticuerpo o a antígeno, es capaz de modular el empalme de ARN in vitro y/o in vivo. Al dirigirse al empalme de ARN, en varias formas de realización, los restos de fármaco y los ADC que se divulgan en la presente son agentes antiproliferativos potentes. En varias formas de realización, los restos de fármaco y de los ADC que se divulgan en la presente se pueden dirigir tanto las células con actividad de división como las células en reposo.

[0269] En varias formas de realización, la presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que ciertos moduladores de empalme biológicamente activos pueden proveer propiedades mejoradas cuando se los usa en ADC. Aunque un modulador de empalme puede demostrar rasgos mejorados deseables (por ej., unión robusta al complejo de espliceosoma SF3b, modulación potente del empalme de ARN), cuando se encuentra solo, en varias formas de realización, el modulador de empalme puede exhibir menos de los mismos rasgos mejorados deseables cuando se conjuga con un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno. Por ende, el desarrollo y la producción de un ADC para usar como agente terapéutico humano, por ej., como agente oncológico, puede exigir más que la identificación de un anticuerpo capaz de unirse a un objetivo u objetivos deseables y unirse por sí solo a un fármaco para tratar cáncer. Enlazar el anticuerpo con el fármaco puede tener efectos significativos en la actividad de uno o los dos anticuerpo y fármaco, efectos que pueden variar según el tipo de enlazador y/o el fármaco seleccionado. En consecuencia, en algunas formas de realización, los componentes del ADC se seleccionan para (i) retener una o más propiedades terapéuticas que el anticuerpo y los restos de fármaco exhibieron en aislamiento, (ii) mantener las propiedades específicas de unión del fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno; (iii) optimizar la carga de fármaco y los índices de fármaco–a–anticuerpo; (iv) permitir la entrega, por ej., la entrega intracelular, del resto de fármaco a través de un anexo estable al fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno; (v) retener la estabilidad del ADC como conjugado intacto hasta el transporte o la entrega en el sitio objetivo; (vi) minimizar la agregación del ADC antes o después de la administración; (vii) permitir el efecto terapéutico, por ej., el efecto citotóxico, del resto de fármaco después de la escisión o de otro mecanismo de liberación en el entorno celular; (viii) exhibir eficacia in vivo en el tratamiento anticáncer comparable o superior a la del anticuerpo o los restos del fármaco en aislamiento; (ix) minimizar la muerte fuera del objetivo para el resto del fármaco; y/o (x) exhibir propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, formulabilidad y perfiles toxicológicos e inmunológicos deseables. Cada una de estas propiedades puede ser necesaria para identificar un ADC mejorado para uso terapéutico (Ab et al. (2015) Mol Cancer Ther. 14:1605–13).

[0270] En varias formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente

exhiben propiedades favorables inesperadas en varias o cada una de las categorías que se enumeran en lo que precede. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los constructos de ADC que se divulgan en la presente exhiben carga de fármaco, agregación y/o perfiles de estabilidad en extremo favorables y/o preservar la función de unión a anticuerpo, actividad del fármaco y/o muerte de terceros mejorada, al tiempo que reduce la muerte fuera del objetivo, en comparación con los ADC que comprenden un enlazador alternativo y/o un resto de fármaco (por ej., un modulador de empalme alternativo). En algunas formas de realización, los constructos de ADC que se divulgan en la presente demuestran estabilidad, actividad, potencia u otro efecto superiores (medido in vivo o in vitro) en comparación con los ADC que usan un enlazador alternativo y/o un resto de fármaco (por ej., un modulador de empalme alternativo). En algunas formas de realización, los constructos de ADC que se divulgan en la presente exhiben eficacia de tratamiento in vivo cuando se administran en una dosis única. En algunas formas de realización, los constructos de ADC que se divulgan en la presente son bastante estables en comparación con los ADC que usan un enlazador alternativo y/o un resto de fármaco (por ej., un modulador de empalme alternativo).

[0271] Los compuestos de ADC de la presente divulgación pueden entregar selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico o citostático a las células cancerosas o a un tejido tumoral. Se ha descubierto que los ADC que se divulgan en la presente tienen actividad citotóxica y/o citostática potente contra células que expresan el antígeno objetivo respectivo (por ej., HER2, CD138, EPHA2, , MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4, STEAP1). En algunas formas de realización, la actividad citotóxica y/o citostática del ADC depende de la expresión del antígeno objetivo en una célula. En algunas formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente son efectivos en especial para matar células cancerosas que expresan un antígeno objetivo al tiempo que minimizan la muerte fuera del objetivo. En algunas formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente no exhiben efecto citotóxico ni citostático en las células cancerosas que no expresan un antígeno objetivo.

[0272] Los ejemplos de cánceres que expresan HER2 incluyen, a título enunciativo y no taxativo, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma de células uroteliales, cáncer de esófago, cáncer de pulmón (por ej., adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ej., carcinoma seroso de endometrio uterino), carcinoma de los conductos salivales, cáncer de cérvix, cáncer de endometrio y cáncer de ovarios (English et al. (2013) Mol Diagn Ther. 17:85–99).

[0273] Los ejemplos de cánceres que expresan CD138 incluyen, a título enunciativo

y no taxativo, cáncer intratorácico (por ej., cáncer de pulmón, mesotelioma), cáncer de piel (por ej., carcinoma de células basales carcinoma de células escamosas), cáncer de cabeza y cuello (por ej., laríngeo, hipofaríngeo, nasofaríngeo), cáncer de mama, cáncer urogenital (por ejemplo, cáncer de cérvix, cáncer de ovarios, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer urotelial), enfermedades malignas hematológicas (por ej., mieloma tal como mieloma múltiple, enfermedades malignas de las células B, linfoma de Hodgkin), y cáncer de tiroides (Szatmári et al. (2015) Dis Markers 2015:796052).

[0274] Los ejemplos de cánceres que expresan EPHA2 incluyen cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de esófago, y cáncer gástrico (Tandon et al. (2011) Expert Opin Ther Targets 15(1):31–51).

[0275] En algunas formas de realización, la escisión de un ADC libera al modulador de empalme del fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno y del enlazador. En algunas formas de realización, el enlazador y/o modulador de empalme están diseñados para facilitar la muerte de terceros (la muerte de células vecinas). En algunas formas de realización, el enlazador y/o el modulador de empalme están diseñados para facilitar la muerte de terceros mediante escisión después de la internalización y difusión celular del resto de enlazador–fármaco y/o del resto de fármaco solo en las células vecinas. En algunas formas de realización, el enlazador promueve la internalización celular. En algunas formas de realización, el enlazador está diseñado para minimizar la escisión en el entorno extracelular y, por ende, reducir la toxicidad en tejido fuera del objetivo (por ej., el tejido no canceroso), al tiempo que preserva la unión del ADC al tejido objetivo y la muerte de terceros de tejido canceroso que no expresa un antígeno objetivo del fragmento de unión a anticuerpo o antígeno de un ADC, pero rodea al tejido canceroso objetivo que expresa dicho antígeno. En algunas formas de realización, el resto de fármaco, o el catabolito del resto de fármaco producido por la escisión de un ADC, está diseñado para facilitar la captación de células objetivo o células vecinas (es decir, células permeables). Tales restos de fármaco y catabolitos se pueden mencionar en la presente como «terceros activos», mientras que los restos de fármaco o catabolitos con permeabilidad celular reducida se pueden mencionar como «terceros inactivos».

[0276] En algunas formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente también demuestran actividad de muerte de terceros, pero menor citotoxicidad fuera del objetivo. Sin restringirse a la teoría, la actividad de muerte de terceros de un ADC puede ser beneficiosa en particular cuando su penetración en un tumor sólido está limitada y/o la expresión del antígeno objetivo entre las células cancerosas es heterogénea. En algunas

formas de realización, un ADC que comprende un enlazador escindible es eficaz en particular en muerte de terceros y/o demuestra actividad mejorada de muerte de terceros, en relación con el tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador no escindible. En algunas formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente exhiben solubilidad y penetración de células objetivo mejoradas en comparación con los restos de fármaco por sí solos. En algunas formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente exhiben citotoxicidad mejorada en comparación con el resto de fármaco por sí solo. En algunas formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente usan restos de fármaco que exhiben menor citotoxicidad cuando se los evalúa como fármacos autónomos, pero son mucho mejores que los ADC que comprenden otros restos de fármaco con mayor citotoxicidad cuando se los evalúa como fármacos autónomos. En algunas formas de realización, la escisión y liberación del modulador de empalme mejora la citotoxicidad del ADC, en relación con el tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador no escindible. En otras formas de realización, la escisión y liberación del modulador de empalme no son necesarias para que un ADC tenga una actividad biológica deseable. En algunas formas de realización, un ADC que comprende un enlazador no escindible que tiene un espaciador de longitud aumentado (por ej., ADL12) provee la misma o similar citotoxicidad en relación con el tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador escindible (por ej., ADL1, ADL5) y citotoxicidad en extremo superior en relación con el tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador no escindible más corto. En algunas formas de realización, un ADC que comprende un espaciador de longitud aumentado sin un grupo carbonilo (por ej., ADL12) provee la misma o similar citotoxicidad relativa en comparación con el tratamiento con un ADC que comprende un enlazador escindible (por ej., ADL1, ADL5) y citotoxicidad en extremo superior en relación con el tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador no escindible que tiene un espaciador de longitud igual o similar con un grupo carbonilo (por ej., ADL10). En algunas formas de realización, la eliminación de un grupo carbonilo de un enlazador no escindible MC (por ej., ADL12) puede dar como resultado un aumento mayor de 50 veces, mayor de 75 veces, mayor de 100 veces, mayor de 150 veces, o mayor de 200 veces de citotoxicidad, en relación con el tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador MC no escindible no modificado (por ej., ADL10). En algunas formas de realización, la eliminación del grupo carbonilo de un enlazador MC no escindible (por ej., ADL12) y un espaciador de longitud aumentado (por ej., además de al menos una unidad de espaciador) puede dar como resultado un aumento de más de 50 veces, más de 75 veces, más de 100 veces, más de 150 veces o más de 200 veces en la citotoxicidad en relación con los tratamientos

comparables con un ADC que comprende un enlazador MC no escindible no modificado (por ej., ADL10).

[0277] En la presente se proveen compuestos de ADC que comprenden un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno de ellos (Ab) cuyo objetivo es una célula tumoral, un resto de fármaco modulador de empalme (D), y un resto de enlazador (L) que enlaza Ab a D por unión covalente. En ciertos aspectos, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno es capaz de unirse a un antígeno asociado a un tumor (por ej., HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4, STEAP1) con alta especificidad y afinidad. En ciertas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno se internaliza en una célula objetivo en el momento de la unión, por ej., en un compartimiento degradativo en la célula. En varias formas de realización, los ADC que se internalizan al unirse con la célula objetivo, se someten a degradación y liberan el resto de fármaco modulador de empalme para matar se pueden usar. El resto de fármaco modulador de empalme se puede liberar del anticuerpo y/o del resto del ADC por acción enzimática, hidrólisis, oxidación u otro mecanismo cualquiera.

[0278] Un ejemplo de ADC tiene la Fórmula (I):

$$Ab–(L–D)_p \qquad (I)$$

donde Ab = fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno, L = un resto enlazador, D = un resto de fármaco modulador de empalme, y *p* = el número de restos de fármacos moduladores de empalme por fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno.

[0279] En ciertas formas de realización preferidas, el resto dirigido a fármacos para usar en los ADC y las composiciones descriptos es un fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno. Otros ejemplos de restos dirigidos a fármacos para usar en los ADC y las composiciones descriptos también se proveen y se describen en la presente. En algunas formas de realización, un resto dirigido a un fármaco puede ser cualquiera de una variedad de agente de unión a células y andamiaje para no anticuerpos. En algunas formas de realización, el resto dirigido a un fármaco es un agente de unión a células. Tal como se lo usa en la presente, el término «agente de unión a células» se refiere a cualquier agente capaz de unirse a una célula animal (por ej., humana) y entregar un resto de fármaco (por ej., un resto de fármaco modulador de empalme tal como se divulga en la presente). El término abarca los ejemplos de fragmentos de unión a anticuerpos y antígenos que se divulga en la presente (por ej., anticuerpos monoclonales y sus fragmentos, tales como Fab y scFV). El término incluye además los ejemplos de agentes de unión a células tales como proteínas de repetición de ankirina diseñadas DARPin, cuerpos dobles, péptidos bicíclicos, nanocuerpos, centrinos, MSH (melanotropina), receptor–Fc de moléculas de

fusión, estructuras de receptor de células T, hormonas esteroides tales como andrógenos y estrógenos, factores de crecimiento, factores de estimulación de la colonia tales como EGF, y otros andamiajes sin anticuerpos. En varias formas de realización, los andamiajes no anticuerpo pueden caer en el sentido amplio en dos clases estructurales, a saber, compuestos de tamaño del dominio (aproximadamente entre 6 y 20 kDa) y los péptidos restringidos (aproximadamente entre 2 y 4 kDa). Los ejemplos de los andamiajes del tamaño del dominio incluyen, a título enunciativo y no taxativo, proteínas artificiales diseñadas para unirse selectivamente a antígenos, anticalinas, atrímeros, proteínas de repetición de ankirina, andamiajes FN3 (por ej., adnectinas y centirinas), finómeros, dominios Kunitz, pronectinas. cuerpos O, y proteínas de fusión pronectinas, mientras que los péptidos de ejemplo restringidos incluyen proteínas de avímeros, péptidos bicíclicos y otros nudos Cys. En algunas formas de realización, el resto dirigido al fármaco usado en la descripción de los ADC y las composiciones se seleccionan entre un aficuerpo, una afilina, una anticalina, un atrímero, una proteína de repetición de ankirina, un andamiaje FN3 tal como adnectina o centrina, un finómero, un dominio Kunitz, una pronectina, un cuerpo O, un avímero, un péptido bicíclico y un nudo cis. En algunas formas de realización, el resto de objetivo de tratamiento del fármaco que se usa en los ADC descriptos y en las composiciones es u receptor Fc de proteína de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión quimérica, por ej., la proteína quimérica de fusión HER2–Fc. No se revisan andamiajes de anticuerpos, por ej., en Vazquez–Lombardi et al. (2015) Drug Dis Today 20(10):1271–83.

Anticuerpos

[0280] El anticuerpo o los fragmentos de unión a anticuerpo o antígeno (Ab) de Fórmula (I) incluyen dentro de su alcance cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se una de manera especial a objetivos de antígeno en una célula cancerígena. El fragmento de unión a anticuerpo o antígeno se puede unir a un antígeno objetivo sin una constante de disolución (K_D) de ≤1 mM, ≤100 nM o ≤10 nM, o cualquier monto intermedio según se mide en, por ej., análisis en BIAcore®. En ciertas formas de realización, la K_D es de entre 1 pM y 500 pM. En algunas formas de realización, la K_D es entre 500 pM y 1 µM, entre 1 µM y 100 nM, o entre 100 mM y 10 nM.

[0281] En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno es una cadena de cuatro anticuerpos (también se menciona como una inmunoglobulina o un anticuerpo intacto o de cadena completa) que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno es una cadena doble de medio cuerpo (una cadena ligera y una cadena pesada) o un fragmento de unión a antígeno de una inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno es un

fragmento de unión a antígeno en una inmunoglobulina que retiene la capacidad de unirse al antígeno de unión al cáncer y/o proveer una función de una inmunoglobulina.

[0282] En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno es un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno de ellos. En algunas formas de realización, el fragmento de unión a anticuerpo o a antígeno es un fragmento de anticuerpo de internalización o un antígeno de internalización de ellos. En algunas formas de realización, el fragmento de internalización de anticuerpo o de antígeno de ellos se une al antígeno del cáncer objetivo que se expresa en la superficie de una célula e ingresa a la célula con la unión. En algunas formas de realización, el resto de fármaco modulador de empalme del ADC se libera del fragmento de anticuerpo o antígeno del ADC después de que el ADC ingresa y está presente en una célula que expresa el antígeno de cáncer objetivo (es decir, después de que el ADC se ha internalizado), por ej., por escisión, por degradación del fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno, o por cualquier otro mecanismo de liberación apto.

[0283] Las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de anticuerpos de la presente invención se establecen en las Tablas 2 a 4.

Tabla 1. Anticuerpos

mAb	**Tipo**	**Blanco**
trastuzumab (AB185)	Humanizado	HER2/NEU
B–B4 (AB205)	Murino	CD138 (sindecan–1)
1C1 (AB206)	Humanizado	EPHA2

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de regiones variables de mAb

mAb	**Cadena de IgG**	**SEQ ID NO**	**Secuencia de aminoácidos**
trastuzumab (AB185)	Cadena pesada	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA ILQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS
trastuzumab (AB185)	Cadena liviana	20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR T

B–B4 (AB205)	Cadena pesada	21	QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKAT GYTFSNYWIQRPGHGLEWIGEILPGT GRTIYNEKFKGKATFTADISSNTVQM QLSSLTSEDSAVYYCARRDYYGNFYYA MDYWGQGTSVTVSS
B–B4 (AB205)	Cadena liviana	22	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQ GINNILNWYQQKPDGTVELLIYYTSTL QSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPE DIGTYYCQQYSKLPRTFGGGTKLEIK
1C1 (AB206)	Cadena pesada	23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSHYMMAWVRQAPGKGLEWVSRI GPSGGPTHYADSVKGRFTISRDNSKN TLILQMNSLRAEDTAVYYCAGYDSGY DYVAVAGPAE– YFQHWGQGTLVTVSS
1C1 (AB206)	Cadena liviana	24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASNL HTGVPSRFSGSGSGTEFSLTISGLQPD DFATYYCQQYNSYS–RTFGQGTKVEIK

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de CDR de mAb

mAb	**Cadena de IgG**	**SEQ ID NO**	**Secuencia de aminoácidos**
trastuzumab (AB185)	HCDR1	1	GFNIKDTYIH
trastuzumab (AB185)	HCDR2	2	RIYPTNGYTRYADSVKG
trastuzumab (AB185)	HCDR3	3	WGGDGFYAMDV
trastuzumab (AB185)	LCDR1	4	RASQDVNTAVAW
trastuzumab (AB185)	LCDR2	5	SASFLES
trastuzumab (AB185)	LCDR3	6	QQHYTTPPT
B–B4	HCDR1	7	NYWIE

(AB205)			
B–B4 (AB205)	HCDR2	8	ILPGTGRTIYNEKFKGKA
B–B4 (AB205)	HCDR3	9	RDYYGNFYYAMDY
B–B4 (AB205)	LCDR1	10	ASQGINNILN
B–B4 (AB205)	LCDR2	11	TSTLQS
B–B4 (AB205)	LCDR3	12	QQYSKLPRT
1C1 (AB206)	HCDR1	13	HYMMA
1C1 (AB206)	HCDR2	14	RIGPSGGPTHYADSVKG
1C1 (AB206)	HCDR3	15	YDSGYDYVAVAGPAE–YFQH
1C1 (AB206)	LCDR1	16	RASWSISTWLA
1C1 (AB206)	LCDR2	17	KASNLHT
1C1 (AB206)	LCDR3	18	QQYNSYS–RT

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de cadenas de Ig de mAb de longitud completa

mAb	**Cadena de IgG**	**Clase**	**SEQ ID NO**	**Secuencia de aminoácidos**
trastuzumab (AB185)	Cadena pesada	IgG1	25	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARI YPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAILQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKST

				SGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
trastuzumab (AB185)	Cadena liviana	kappa	26	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQ QHYTTPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE C
B–B4 (AB205)	Cadena pesada	IgG2a	27	QVQLQQSGSELMMPGA SVKISCKATGYTFSNYWI QRPGHGLEWIGEILPGT GRTIYNEKFKGKATFTADI SSNTVQMQLSSLTSEDSA

				VYYCARRDYYGNFYYAM DYWGQGTSVTVSSAKTT PPSVYPLAPGSAAQTNS MVTLGCLVKGYFPEPVT VTWNSGSLSSGVHTFPA VLQSDLYTLSSSVTVPSST WPSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCGCKPCIC TVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDD PEVQFSWFVDDVEVHTA QTQPREEQFNSTFRSVSE LPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKG RPKAPQVYTIPPPKEQM AKDKVSLTCMITDFFPED ITVEWQWNGQPAENYK NTQPIMDTDGSYFVYSKL NVQKSNWEAGNTFTCS VLHEGLHNHHTEKSLSHS PG
B–B4 (AB205)	Cadena liviana	kappa	28	DIQMTQSTSSLSASLGDR VTISCSASQGINNILNWY QQKPDGTVELLIYYTSTL QSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEPEDIGTYYCQQY SKLPRTFGGGTKLEIKRA DAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINV KWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNRNEC
1C1 (AB206)	Cadena pesada	IgG1	29	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSHYMM AWVRQAPGKGLEWVSR

				IGPSGGPTHYADSVKGRF TISRDNSKNTLILQMNSL RAEDTAVYYCAGYDSGY DYVAVAGPAEYFQHWG QGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSL SPG
1C1 (AB206)	Cadena liviana	kappa	30	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISTWLAW YQQKPGKAPKLLIYKASN LHTGVPSRFSGSGSGTEF SLTISGLQPDDFATYYCQ QYNSYSRTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE

				C

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de antígenos blanco ejemplares

Antígeno	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
HER2/NEU	31	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPAS PETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTILPTNASLSFLQDI QEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALA VLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLI QRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACH PCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGP LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHC PALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNILSTD VGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGL GMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD PASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGILYISAWPDSLPDLSVF QNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGL ALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED ECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQ ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTC FGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPI WKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPL TSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQ ETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGA FGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDE AYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLD HVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAKGMSILEDVRLVHRD LAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKV PIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAK PYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM IDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASP LDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEILVPQQGFFCPDPAP GAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPL APSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLQRY SEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPS PREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGG AVENPEILTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQD PPERGAPPSTFKGTPTAENPEILGLDVPV

CD138	32	MRRAALWLWLCALALSLQPALPQIVATNLPPEDQDGS GDDSDNFSGSGAGALQDITLSQQTPSTWKDTQLLTAIP TSPEPTGLEATAASTSTLPAGEGPKEGEAVVLPEVEPGLT AREQEATPRPRETTQLPTTHLASTTTATTAQEPATSHPH RDMQPGHHETSTPAGPSQADLHTPHTEDGGPSATERA AEDGASSQLPAAEGSGEQDFTFETSGENTAVVAVEPDR RNQSPVDQGATGASQGLLDRKEVLGGVIAGGLVGLIFA VCLVGFMLYRMKKKDEGSYSLEEPKQANGGAYQKPTK QEEFYA
EPHA2	33	MELQAARACFALLWGCALAAAAAAQGKEVVLLDFAAA GGELGWLTHPYGKGWDLMQNIMNDMPIYMYSVCNV MSGDQDNWLRTNWVYRGEAERIFIELKFTVRDCNSFP GGASSCKETFNLYYAESDLDYGTNFQKRLFTKIDTIAPDE ITVSSDFEARHVKLNVEERSVGPLTRKGFILAFQDIGACV ALLSVRVYYKKCPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLATVAGT CVDHAVVPPGGEEPRMHCAVDGEWLVPIGQCLCQAG YEKVEDACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGAT SCECEEGFFRAPQDPASMPCTRPPSAPHILTAVGMGAK VELRWTPPQDSGGREDIVYSVTCEQCWPESGECGPCE ASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPHMNYTFTVEARNGV SGLVTSRSFRTASVSINQTEPPKVRLEGRSTTSLSVSWSIP PPQQSRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLDDL APDTTILVQVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPEGSGNL AVIGGVAVGVVLLLVLAGVGFFIHRRRKNQRARQSPED VYFSKSEQLKPLKTYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCV TRQKVIGAGEFGEVYKGMLKTSSGKKEVPVAIKTLKAGY TEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNIIRLEGVISKYKPMMII TEYMENGALDKFLREKDGEFSVLQLVGMLRGIAAGMKI LANMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRVLEDD PEATYTTSGGKIPIRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIV MWEVMTYGERPYWELSNHEVMKAINDGFRLPTPMD CPSAIYQLMMQCWQQERARRPKFADIVSILDKLIRAPD SLKTLADFDPRVSIRLPSTSGSEGVPFRTVSEWLESIKMQ QYTEHFMAAGYTAIEKVVQMTNDDIKRIGVRLPGHQK RIAYSLLGLKDQVNTVGIPI
MSLN	43	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAG

		ETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCAEVSGLST ERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDAL PLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPE RQRLLPAALACWGVRGSLLSEADVRALGGLACDLPGRF VAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPY GPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWR QRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREI DESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLD VLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGILFLKMSPEDIRKWNV TSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVK GRGQLDKDTLDTLTAFYPGILCSLSPEELSSVPPSSIWAV RPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQS FLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTV AEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTL GLGLQGGIPNGILVLDLSMQEALSGTPCLLGPGPVLTVL ALLLASTLA
FOLH1	44	MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGF LFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNF TQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDV LLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDI VPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKIN CSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADY FAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPG YPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMG GSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIH STNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGI DPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAE EFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLR VDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSP SPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNW ETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVR GGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHP QEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPI VLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSH NKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAA FTVQAAAETLSEVA

CDH6	45	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALEL SGNSKNELNRSKRSWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKL HSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRL DREEKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPI FTKEVYTATVPEMSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSA KVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMDRENREQYQV VIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQS TYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGE GLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASN PYVEPRFLILGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIR EDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIF NIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNITVIATEINNPKQSSR VPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTLHA VDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGIL TRKNGYNRHEMSTILLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVC ACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVT VVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDT QAFDIGTLRNPEAIEDNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDN TDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYEGTGSVAD SLSSLESVTTDADQDYDILSDWGPRFKKLADMYGGVDS DKDS
CEACAM5	46	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIE STPFNVAEGKEVLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNR QIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDTG FYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVE DKDAVAFTCEPETQDATILWWVNNQSLPVSPRLQLSN GNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVL YGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFV NGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRT TVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQN TTILWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVG PYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRP GVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNIT EKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSN NSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTILWWVNGQSLPVSP RLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSD

		PVTLDVLYGPDTPIISPPDSSILSGANLNLSCHSASNPSPQ YSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI
CFC1B	47	MTWRHHVRLLFTVSLALQIINLGNSYQREKHNGGREEV TKVATQKHRQSPLNWTSSHFGEVTGSAEGWGPEEPLP YSWAFGEGASARPRCCRNGGTCVLGSFCVCPAHFTGRY CEHDQRRSECGALEHGAWTLRACHLCRCIFGALHCLPL QTPDRCDPKDFLASHAHGPSAGGAPSLLLLLPCALLHRL LRPDAPAHPRSLVPSVLQRERRPCGRPGLGHRL
ENPP3	48	MESTLTLATEQPVKKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGLGL GLGLRKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRG DCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLEASLCSCSD DCLQRKDCCADYKSVCQGETSWLEENCDTAQQSQCPE GFDLPPVILFSMDGFRAEILYTWDTLMPNINKLKTCGIH SKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDV NLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMWLTAMYQGLKA ATYFWPGSEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEERISTLLKWL DLPKAERPRFYTMYFEEPDSSGHAGGPVSARVIKALQV VDHAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYC NKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPRIRAHNIPHDFFSF NSEEIVRNLSCRKPDQHFKPILTPDLPKRLHYAKNVRIDK VHLFVDQQWLAVRSKSNTNCGGGNHGYNNEFRSMEA IFLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNG THGSLNHLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLD CFCPHLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLPFGR PRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYTV PQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFILADKNI THGFLYPPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEEFRKMWD YFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEI TKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDVL PFIIPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVEL LTGLDFYQDKVQPVSEILQLKTILPTFETTI
FOLR1	49	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVC MNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQE AHKDVSILYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSP NLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDC

		RTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYF PTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQG NPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWL LS
HAVCR1	50	MHPQVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYS GAVTSMCWNRGSCSLFTCQNGIVWTNGTHVTYRKDT RYKLLGDLSRRDVSLTIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFN DMKITVSLEIVPPKVTTTPIVTTVPTVTTVRTSTTVPTTTT VPMTTVPTTTVPTTMSIPTTTTVLTTMTVSTTTSVPTTTS IPTTTSVPVTTTVSTFVPPMPLPRQNHEPVATSPSSPQP AETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSYTTDGNDTVTESSDGL WNNNQTQLFLEHSLLTANTTKGIYAGVCISVLVLLALLG VIIAKKYFFKKEVQQLSVSFSSLQIKALQNAVEKEVQAED NIYIENSLYATD
KIT	51	MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSI HPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETNENK QNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKL FLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPL PKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSVL SEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASILLREGEEFTVTCTIKDV SSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATL TISSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTTLEVVDKGFI NIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYM NRTFTDKWEDYPKSENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTY TFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCV AAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGP PFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNF AFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGMMCIIVMILTYK ILQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWE FPRNRLSFGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVA VKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSILGNHMNIVNLLGAC TIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEA ALYKNLLHSKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADK RRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLEDLLSFSYQVAK GMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIK NDSNYVVKGNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSY

		GIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPEH APAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTN HIYSNLANCSPNRQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLV HDDV
MET	52	MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVN MKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDL QKVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNI NMALVVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTAD IQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFIN FFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLKETKDGFMFLTDQSY IDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFH TRIIRFCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNIL QAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAE PMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQHFYGP NHEHCFNRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLF MGQFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRS GPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKI TKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRS EECLSGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWD FGFRRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCTV GPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSISPKY GPMAGGTLLTLTGNILNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSI LECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYREDPIVYEIH PTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFT VACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGIL SKYFDLIYVHNPVFKPFEKPVMISMGNENVLEIKGNDID PEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNS ELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFTGLIAGVVSISTAL LLLLGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVS ARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQ VQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELV QAVQHVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDND GKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSL LGICLRSEGSPLVVLPYMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLI GFGLQVAKGMKILASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKV ADFGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESLQT

		QKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVI LLQGRRLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSEL VSRISAIFSTFIGEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLSSED NADDEVDTRPASFWETS
MUC16	53	MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATL SPKTSTGAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRTTQSL GVMSSALPESTSRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNY PATSMVSGLSSPRTRTSSTEGNFTKEASTYTLTVETTSGP VTEKYTVPTETSTTEGDSTETPWDTRYIPVKITSPMKTFA DSTASKENAPVSMTPAETTVTDSHTPGRTNPSFGTLYSS FLDLSPKGTPNSRGETSLELILSTTGYPFSSPEPGSAGHSR ISTSAPLSSSASVLDNKISETSIFSGQSLTSPLSPGVPEARA STMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQT AETILTFHAFAETMDIPSTHIAKTLASEWLGSPGTLGGTS TSALTTTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPL ETSAPGEESEMTATLVPTLGFTTLDSKIRSPSQVSSSHPT RELRTTGSTSGRQSSSTAAHGSSDILRATTSSTSKASSWT SESTAQQFSEPQHTQWVETSPSMKTERPPASTSVAAPI TTSVPSVVSGFTTLKTSSTKGIWLEETSADTLIGESTAGPT THQFAVPTGISMTGGSSTRGSQGTTHLLTRATASSETSA DLTLATNGVPVSVSPAVSKTAAGSSPPGGTKPSYTMVSS VIPETSSLQSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGH TKISTSIPLLSSASVLEDKVSATSTFSHHKATSSITTGTPEIS TKTKPSSAVLSSMTLSNAATSPERVRNATSPLTHPSPSGE ETAGSVLTLSTSAETTDSPNIHPTGTLTSESSESPSTLSLPS VSGVKTTFSSSTPSTHLFTSGEETEETSNPSVSQPETSVSR VRTTLASTSVPTPVFPTMDTWPTRSAQFSSSHLVSELRA TSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMSQTNRDTFNDSAA PQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSATSLSATVMVSK FTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTNGPGSMAVASTNI PIGKGYITEGRLDTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVS MSVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSRE ITIPRDGTSSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGILSSS PSSPTPKVTMSSTFSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPN LPSTTSLTPSNIPTSGAIGKSTLVPLDTPSPATSLEASEGGL PTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSESPSTIKLTMASVVKPGS

		YTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGSSPEMTAPGETNTGS TWDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTTENHPKT ESATPAAYSGSPKISSSPNLTSPATKAWTITDTTEHSTQL HYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSPTIGSSTLELTSD VPGEPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLDIS SPSSPMSTFAIFPPMSTPSHELSKSEADTSAIRNTDSTTL DQHLGIRSLGRTGDLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQD TLSATMSPTHVTQSLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQ GRSSSEATTFWKPSTDTLSREIETGPTNIQSTPPMDNTT TGSSSSGVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMALERRSSTATV SMAGTMGLLVTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTEGVTD SSKGSSPRLNTQGNTALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSS PTTPDVEFIGGSTFWTKEVTTVMTSDISKSSARTESSSAT LMSTALGSTENTGKEKLRTASMDLPSPTPSMEVTPWISL TLSNAPNTTDSLDLSHGVHTSSAGTLATDRSLNTGVTRA SRLENGSDTSSKSLSMGNSTHTSMTYTEKSEVSSSIHPRP ETSAPGAETTLTSTPGNRAISLTLPFSSIPVEEVISTGITSG PDINSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTIEQSTQPLHAVSSEK VSVQTQSTPYVNSVAVSASPTHENSVSSGSSTSSPYSSA SLESLDSTISRRNAITSWLWDLTTSLPTTTWPSTSLSEALS SGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAAKQRNPETETHGP QNTAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSR SDVSGLTSESTANPSLGTASSAGTKLTRTISLPTSESLVSF RMNKDPWTVSIPLGSHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTV ASDVIDTPSDGAESIPTVSFSPSPDTEVTTISHFPEKTTHS FRTISSLTHELTSRVTPIPGDWMSSAMSTKPTGASPSITL GERRTITSAAPTTSPIVLTASFTETSTVSLDNETTVKTSDIL DARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSTMDVTKTASISPTSIS GMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTYSL DGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTFS TMVSTDTASGENPTSSNSVVTSVPAPGTWTSVGSTTDL PAMGFLKTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTG SSATSEASLLTTSESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATP ESLLVVTETSDTTLTSKILVTDTILFSTVSTPPSKFPSTGTLS GASFPTLLPDTPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSL GTVPETTLTMSETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQGVT

		ESPLHPSSTSPSKIVAPRNTTYEGSITVALSTLPAGTTGSL VFSQSSENSETTALVDSSAGLERASVMPLTTGSQGMAS SGGIRSGSTHSTGTKTFSSLPLTMNPGEVTAMSEITTNRL TATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLTT APPTWGIPQSTLTFEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIP DSDASTASSSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTG FTETPEGSASPSMAGHEPRVPTSGTGDPRYASESMSYP DPSKASSAMTSTSLASKLTTLFSTGQAARSGSSSSPISLST EKETSFLSPTASTSRKTSLFLGPSMARQPNILVHLQTSAL TLSPTSTLNMSQEEPPELTSSQTIAEEEGTTAETQTLTFTP SETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISVPAKTSLVE TTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGTS PGSPEMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETTV PMETTVEPVTLQSTALGSGSTSISHLPTGTTSPTKSPTEN MLATERVSLSPSPPEAWTNLYSGTPGGTRQSLATMSSV SLESPTARSITGTGQQSSPELVSKTTGMEFSMWHGSTG GTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTSPNSVSSLTDKSKHKTET WVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVDEAYSSTSSWS DQTSGSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTTSLVSLPSGDQG ITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIAP TAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTPGISTTITTMGTNSIST TTPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEHPSTWSSTAASD SWTVTDMTSNLKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSM STPHGRITVIGTSLVTPSSDASAVKTETSTSERTLSPSDTT ASTPISTFSRVQRMSISVPDILSTSWTPSSTEAEDVPVSM VSTDHASTKTDPNTPLSTFLFDSLSTLDWDTGRSLSSATA TTSAPQGATTPQELTLETMISPATSQLPFSIGHITSAVTP AAMARSSGVTFSRPDPTSKKAEQTSTQLPTTTSAHPGQ VPRSAATTLDVIPHTAKTPDATFQRQGQTALTTEARATS DSWNEKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLR TLNTLDINLESGTTSSPSWKSSPYERIAPSESTTDKEAIHP STNTVETTGWVTSSEHASHSTIPAHSASSKLTSPVVTTST REQAIVSMSTTTWPESTRARTEPNSFLTIELRDVSPYMD TSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRTEITSSKRISSSFLAQSMRS SDSPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAMQTSPPGATSLSA PTLDTSATASWTGTPLATTQRFTYSEKTTLFSKGPEDTS

		QPSPPSVEETSSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSSTPP VTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEAL STYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEATSSEYSPIPGHTKP SKATSPLVTSHIMGDITSSTSVFGSSETTEIETVSSVNQGL QERSTSQVASSATETSTVITHVSSGDATTHVTKTQATFSS GTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITTQ TGPTGAATQGPILLDTSTMPILTETPLAVTPDFMQSEKT TLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPSSLTPFLVTTIPPATSTL QGQHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTSMEPVTNSPQ NLNNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTASSAH VLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPGSETT DIEGEPTSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAI TEATKMEVPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNSP PMTISTHMTTTQTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSV VTEGFAHSKITTAMNNDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQ APVLVTTLPSSVAFTPQWHSTSSPVSMSSVLTSSLVKTA GKVDTSLETVTSSPQSMSNTLDDISVTSAATTDIETTHPS INTVVTNVGTTGSAFESHSTVSAYPEPSKVTSPNVTTST MEDTTISRSIPKSSKTTRTETETTSSLTPKLRETSISQEITSS TETSTVPYKELTGATTEVSRTDVTSSSSTSFPGPDQSTVS LDISTETNTRLSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDTFT MDPSNTTPQAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVS WTSPPSVDKTSSPSSFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSSP MTSLLTSGLVKITDILRTRLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSK DSKDTKEIFPSINTEETNVKANNSGHESHSPALADSETPK ATTQMVITTTVGDPAPSTSMPVHGSSETTNIKREPTYFL TPRLRETSTSQESSFPTDTSFLLSKVPTGTITEVSSTGVNS SSKISTPDHDKSTVPPDTFTGEIPRVFTSSIKTKSAEMTITT QASPPESASHSTLPLDTSTTLSQGGTHSTVTQGFPYSEV TTLMGMGPGNVSWMTTPPVEETSSVSSLMSSPAMTS PSPVSSTSPQSIPSSPLPVTALPTSVLVTTTDVLGTTSPES VTSSPPNLSSITHERPATYKDTAHTEAAMHHSTNTAVTN VGTSGSGHKSQSSVLADSETSKATPLMSTTSTLGDTSVS TSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLRESSTSEKTSSTTETNT AFSYVPTGAITQASRTEISSSRTSISDLDRPTIAPDISTGMI TRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGILPWDTSTT

		LFQGGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPV EETSSGFSLMSPSMTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTS VLVTTTNVLGTTSPEPVTSSPPNLSSPTQERLTTYKDTAH TEAMHASMHTNTAVANVGTSISGHESQSSVPADSHTS KATSPMGITFAMGDTSVSTSTPAFFETRIQTESTSSLIPGL RDTRTSEEINTVTETSTVLSEVPTTTTTEVSRTEVITSSRTT ISGPDHSKMSPYISTETITRLSTFPFVTGSTEMAITNQTG PIGTISQATLTLDTSSTASWEGTHSPVTQRFPHSEETTT MSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHSSLYSA VSGSSPTSALPVTSLLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPSA SSFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTTNSMHKL HSSVSIHSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETK NVDRDSTSPLTPELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLD AATEVSRAEVTYYDPTFMPASAQSTKSPDISPEASSSHS NSPPLTISTHKTIATQTGPSGVTSLGQLTLDTSTIATSAGT PSARTQDFVDSETTSVMNNDLNDVLKTSPFSAEEANSL SSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVPTPTLAKI TDMDTNLEPVTRSPQNLRNTLATSEATTDTHTMHPSIN TAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVITSTSG DSIVSTSMPRSSAMKKIESETTFSLIFRLRETSTSQKIGSSS DTSTVFDKAFTAATTEVSRTELTSSSRTSIQGTEKPTMSP DTSTRSVTMLSTFAGLTKSEERTIATQTGPHRATSQGTL TWDTSITTSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTSRVPEYISG TSPPSVEKTSSSSSLLSLPAITSPSPVPTTLPESRPSSPVHLT SLPTSGLVKTTDMLASVASLPPNLGSTSHKIPTTSEDIKDT EKMYPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPAYSEPPKVTSP MVTSFNIRDTIVSTSMPGSSEITRIEMESTFSLAHGLKGT STSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVASSRRTSIPG PDHSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTIITRTGPPLGST SQGTFTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNK DPEILSWTIPPSIEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSSTLPKTI HTTPSPMTSLLTPSLVMTTDTLGTSPEPTTSSPPNLSSTS HEILTTDEDTTAIEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGSQSS VLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVSTSMSVSSETTKIK RESTYSLTPGLRETSISQNASFSTDTSIVLSEVPTGTTAEVS RTEVTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRTMTRLFASPTMTE

		SAEMTIPTQTGPSGSTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLT QRFPHSEMTTLMSRGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSLLS LPATTSPPPISSTLPVTISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMLHT SPELVTSSPPKLSHTSDERLTTGKDTTNTEAVHPSTNTAA SNVEIPSSGHESPSSALADSETSKATSPMFITSTQEDTTV AISTPHFLETSRIQKESISSLSPKLRETGSSVETSSAIETSAV LSEVSIGATTEISRTEVTSSSRTSISGSAESTMLPEISTTRKII KFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGSTSESTFTLDTSTTPSLV ITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPRPSSLPVEETSPP SSQLSLSAMISPSPVSSTLPASSHSSSASVTSLLTPGQVKT TEVLDASAEPETSSPPSLSSTSVEILATSEVTTDTEKIHPFS NTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIM GDTSVSTLTPALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLA TEANTVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTSMSGPEQSTM SQDISIGTIPRISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTLESTLN LNTATTPSWVETHSIVIQGFPHPEMTTSMGRGPGGVS WPSPPFVKETSPPSSPLSLPAVTSPHPVSTTFLAHIPPSPL PVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGTSSSSSLSTTSHERLTTY KDTAHTEAVHPSTNTGGTNVATTSSGYKSQSSVLADSS PMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASSLTPGLRE SSGSEGTSSGTKMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPA QSTISPDISTRTVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGAT TQGTSTLDTSSTTSLTMTHSTISQGFSHSQMSTLMRRG PEDVSWMSPPLLEKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPES ISSSPLPVTSLLTSGLAKTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTS VEILATSEVTTDTEKTHPSSNRTVTDVGTSSSGHESTSFV LADSQTSKVTSPMVITSTMEDTSVSTSTPGFFETSRIQTE PTSSLTLGLRKTSSSEGTSLATEMSTVLSGVPTGATAEVS RTEVTSSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIMTESA EMMIKTQTDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQ RFSHSEMTTLVSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLP ATTSPSPVSSTLVEDFPSASLPVTSLLNPGLVITTDRMGIS REPGTSSTSNLSSTSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAV TNVRTSISGHESQSSVLSDSETPKATSPMGTTYTMGETS VSISTSDFFETSRIQIEPTSSLTSGLRETSSSERISSATEGST VLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTSMSGPDQFTISPDISTE

		AITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGATSEGTLTLDTSTTT FWSGTHSTASPGFSHSEMTTLMSRTPGDVPWPSLPSV EEASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALLTLG PVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREK IHPSSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMAT TSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQE TSSATERSASLSGMPTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGPA QSTISPEISTETITRISTPLTTTGSAEMTITPKTGHSGASSQ GTFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPMSRGP EDVSWPSRPSVEKTSPPSSLVSLSAVTSPSPLYSTPSESSH SSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSPPSMNITS DESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSS YPGLPEPSKVTSPVVTSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTS TLTPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQ VMSSSRGPSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMT ITTQTGSPGATSRGTLTLDTSTTFMSGTHSTASQGFSHS QMTALMSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSSPVMTS SSPVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTTELLGTSSEPETS SPPNLSSTSAEILAITEVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPS SVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLTSTPAFSDTSRIQ TKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTGATTEV SRTEAISSSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKES TDMAITPKTGPSGATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATT QRFPQSVVTTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPPSSLVS SSSVTSPSPLYSTPSGSSHSSPVPVTSLFTSIMMKATDML DASLEPETTSAPNMNITSDESLAASKATTETEAIHVFENT AASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVISPVVTSSSIRDNM VSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSTET STVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLD ISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQVTLPLGT SMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLMSRGPESLSWTSP RFVETTRSSSSLTSLPLTTSLSPVSSTLLDSSPSSPLPVTSLIL PGLVKTTEVLDTSSEPKTSSSPNLSSTSVEIPATSEIMTDT EKIHPSSNTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSM GITSAVDDTTVFTSNPAFSETRRIPTEPTFSLTPGFRETST SEETTSITETSAVLYGVPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPDS

		DQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSESTQMTITTQKSSPG ATAQSTLTLATTTAPLARTHSTVPPRFLHSEMTTLMSRS PENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPSVSSTLPQSIPS SSFSVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTSVEILAA SEVTTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSVSIHSEP SKATYPVGTPSSMAETSISTSMPANFETTGFEAEPFSHLT SGFRKTNMSLDTSSVTPTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSS AKTSSPDWPPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPE SRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTS FATTGVPRAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTP VPFSSSTFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESST TEGRLVMVSTLDTSSQPGRTSSSPILDTRMTESVELGTV TSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEAAHRGTIRPVK GPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTALKTT SRATLTTSVYTPTLGTLTPLNASMQMASTIPTEMMITTP YVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTA SLVSRSGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPT VSKTTPNFFHSELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPSELD ALTPLVTISGTDTSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETS STIPRTIPNFSHHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPG AEDLVTSQVTSSGTDRNMTIPTLTLSPGEPKTIASLVTHP EAQTSSAIPTSTISPAVSRLVTSMVTSLAAKTSTTNRALT NSPGEPATTVSLVTHPAQTSPTVPWTTSIFFHSKSDTTPS MTTSHGAESSSAVPTPTVSTEVPGVVTPLVTSSRAVISTT IPILTLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPTPTVSPGVPGV VTSLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAG SAVPTVLPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTLPTLTLSPGEPE TTPSMATSHGAEASSTVPTVSPEVPGVVTSLVTSSSGVN STSIPTLILSPGELETTPSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGV SGVVTPLVTSSRAVTSTTIPILTLSSSEPETTPSMATSHGV EASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSRAVTSTTIPTLTISSDE PETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQGLVTSLVTSSGS ETSAFSNLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVVPTLTVS TGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPSTVT SPEAESSSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPES PHESEATASWVTHPAVTSTTVPRTTPNYSHSEPDTTPSI

		ATSPGAEATSDFPTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITI PTLTLSSGEPETTTSFITYSETHTSSAIPTLPVSPGASKMLT SLVISSGTDSTTTFPTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMV PRTTPKFSHSKSDTTLPVAITSPGPEASSAVSTTTISPDMS DLVTSLVPSSGTDTSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHPAE TSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSPGVDTRSGVPTTT IPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSA THPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTPV SRTTSSFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPE MVTSQITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRT ETSKTFPASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSS LFTLLVTGTSRVDLSPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTM IPTSTLSLGLLETTGLLATSSSAETSTSTLTLTVSPAVSGLSS ASITTDKPQTVTSWNTETSPSVTSVGPPEFSRTVTGTTM TLIPSEMPTPPKTSHGEGVSPTTILRTTMVEATNLATTGS SPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGMSTLASESVTSRTS YNHRSWISTTSSYNRRYWTPATSTPVTSTFSPGISTSSIPS STAATVPFMVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNAT ERELQGLLKPLFRNSSLEILYSGCRLASLRPEKDSSATAVD AICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLD RNSLYVNGFTHRSSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPS PTTAGPLLMPFTLNFTITNLQYEEDMRRTGSRKFNTME SVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATGV DAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIEELGPYTLD RNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSLSSP TIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTE RVLQGLLGPIFKNTSVGPLYSGCRLTSLRSEKDGAATGV DAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYTLD RNSLYVNGFTHRTSVPTSSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSP ATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEEDMHRPGSRKFNTTERVL QTLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAI CTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRN SLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSGTPSSLPSPTTA GPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSL LGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTH RLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLY

		VNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAG PLLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTERVLQGL LGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRPEKNGAATGMDAICS HRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSL YVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTTAV PLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTERVLQGL LGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHH LNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLY VNGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTTG PLLVPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNITESVLQGLL KPLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGVATRVDAICTHRP DPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVN GFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGPVL LPFTLNFTITNLQYEEDMRRPGSRKFNTTERVLQGLLMP LFKNTSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRVDAVCTHRPD PKSPGLDRERLYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNG FTHQSSMTTTRTPDTSTMHLATSRTPASLSGPMTASPLL VLFTINFTITNLRYEENMHHPGSRKFNTTERVLQGLLRPV FKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAATKVDAICTYRPDPK SPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFT QRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLVLF TLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFK STSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSP RLDREQLYWELSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGFTHR SSVSTTSTPGTPTVILGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNF TITNLRYEENMWPGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVG PLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPTGPGLDR EQLILELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTT STGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGQPGSLKFNITDN VMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVD LLCTILQPLSGPGLPIKQVFHELSQQTHGITRLGPYSLDKD SLILNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFLPPLSEATTAMGYHL KTLTLNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLF QKSSMGPFILGCQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPV GPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDRDSLFINGYA PQNLSIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPTSSEYITLLRDIQD

		KVTTLYKGSQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVKALFSSN LDPSLVEQVFLDKTLNASFHWLGSTYQLVDIHVTEMESS VYQPTSSSSTQHFILNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRN KRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTG VDSLCNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLD RSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGVI TCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYQSHLDLEDL Q
SLC39A6	54	MARKLSVILILTFALSVTNPLHELKAAAFPQTTEKISPNW ESGINVDLAISTRQYHLQQLFYRYGENNSLSVEGFRKLLQ NIGIDKIKRIHIHHDHDHHSDHEHHSDHERHSDHEHHSE HEHHSDHDHHSHHNHAASGKNKRKALCPDHDSDSSG KDPRNSQGKGAHRPEHASGRRNVKDSVSASEVTSTVY NTVSEGTHFLETIETPRPGKLFPKDVSSSTPPSVTSKSRVS RLAGRKTNESVSEPRKGFMYSRNTNENPQECFNASKLL TSHGMGIQVPLNATEFNILCPAIINQIDARSCLIHTSEKKA EIPPKTYSLQIAWVGGFIAISIISFLSLLGVILVPLMNRVFF KFLLSFLVALAVGTLSGDAFLHLLPHSHASHHHSHSHEEP AMEMKRGPLFSHLSSQNIEESAYFDSTWKGLTALGGLY FMFLVEHVLTLIKQFKDKKKKNQKKPENDDDVEIKKQLS KYESQLSTNEEKVDTDDRTEGILRADSQEPSHFDSQQPA VLEEEEVMIAHAHPQEVYNEYVPRGCKNKCHSHFHDTL GQSDDLIHHHHDYHHILHHHHHQNHHPHSHSQRYSRE ELKDAGVATLAWMVIMGDGLHNFSDGLAIGAAFTEGL SSGLSTSVAVFCHELPHELGDFAVLLKAGMTVKQAVLY NALSAMLAILGMATGIFIGHYAENVSMWIFALTAGLFM YVALVDMVPEMLHNDASDHGCSRWGYFFLQNAGMLL GFGIMLLISIFEHKIVFRINF
SLC44A4	55	MGGKQRDEDDEAYGKPVKYDPSFRGPIKNRSCTDVICC VLFLLFILGYIVVGIVAWLYGDPRQVLYPRNSTGAYCGM GENKDKPILLYFNIFSCILSSNIISVAENGLQCPTPQVCVSS CPEDPWTVGKNEFSQTVGEVFYTKNRNFCLPGVPWN MTVITSLQQELCPSFLLPSAPALGRCFPWTNVTPPALPGI TNDTTIQQGISGLIDSLNARDISVKIFEDFAQSWYWILVA LGVALVLSLLFILLLRLVAGPLVLVLILGVLGVLAYGIYYCW EEYRVLRDKGASISQLGFTTNLSAYQSVQETWLAALIVLA

		VLEAILLLMLIFLRQRIRIAIALLKEASKAVGQMMSTMFY PLVTFVLLLICIAYWAMTALILATSGQPQYVLWASNISSP GCEKVPINTSCNPTAHLVNSSCPGLMCVFQGYSSKGLIQ RSVFNLQIYGVLGLFWTLNWVLALGQCVLAGAFASFY WAFHKPQDIPTFPLISAFIRTLRYHTGSLAFGALILTLVQI ARVILEYIDHKLRGVQNPVARCIMCCFKCCLWCLEKFIKF LNRNAYIMIAIYGKNFCVSAKNAFMLLMRNIVRVVVLD KVTDLLLFFGKLLVVGGVGVLSFFFFSGRIPGLGKDFKSP HLNYYWLPIMTSILGAYVIASGFFSVFGMCVDTLFLCFLE DLERNNGSLDRPYYMSKSLLKILGKKNEAPPDNKKRKK
STEAP1	56	MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDILHKDTGETSML KRPVLLHLHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQWHLPIKI AAIIASLTFLYTLLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLP MVSITLLALVILPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKW MLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYSLSYPMRRSYRYKLLNWA YQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLA VTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWN KWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLIFKSILFLPCLRKKI LKIRHGWEDVTKINKTEICSQL

[0284] En diversas formas de realización, un ADC divulgado en la presente puede comprender cualquier serie de dominios variables de cadena pesada y liviana enumerados en las tablas anteriores, o la serie de seis secuencias de CDR de la serie de cadena pesada y liviana, por ejemplo, trasplantando las seis CDR en un marco de anticuerpo de donante humano elegido. En diversas formas de realización, un ADC divulgado en la presente puede comprender secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias enumeradas en las tablas anteriores, en tanto que el ADC conserve la capacidad para unirse a su antígeno cancerígeno blanco (por ejemplo, con un valor de K_D menor a 1×10^{-8} M) y conserve una o más propiedades funcionales de los ADC divulgados en la presente (por ejemplo, capacidad para internalizar, modular el empalme de ARN, inhibir el crecimiento celular, etc.).

[0285] En algunas formas de realización, el ADC además comprende dominios constantes de cadena pesada y liviana humanos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, el ADC puede comprender un dominio constante de cadena pesada de IgG humana (tal como una IgG1) y un dominio constante de cadena liviana kappa o lambda humana. En diversas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de los ADC descritos comprende un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina G

subtipo 1 (IgG1) humana con un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0286] En diversas otras formas de realización, el antígeno cancerígeno blanco para un ADC es el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).

[0287] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena liviana, a saber: CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que consiste en SEQ ID NO:1, CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que consiste en SEQ ID NO:2, CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que consiste en SEQ ID NO:3; CDR1 de cadena liviana (LCDR1) que consiste en SEQ ID NO:4, CDR2 de cadena liviana (LCDR2) que consiste en SEQ ID NO:5, y CDR3 de cadena liviana (LCDR3) que consiste en SEQ ID NO:6, según se define por el sistema de numeración de Kabat.

[0288] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:19 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de SEQ ID NO:20, o secuencias que son al menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:19 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:20.

[0289] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0290] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:19 o una secuencia que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:19, y la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:20 o una secuencia que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:20. En formas de realización particulares, el anticuerpo anti–HER2 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:19 y la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de

SEQ ID NO:20, o secuencias que son al menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:19 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:20. En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 es trastuzumab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0291] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena liviana de trastuzumab o en donde las CDR incluyen no más de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos de HCDR1 (SEQ ID NO:1), HCDR2 (SEQ ID NO:2), HCDR3 (SEQ ID NO:3); LCDR1 (SEQ ID NO:4), LCDR2 (SEQ ID NO:5) y LCDR3 (SEQ ID NO:6).

[0292] En diversas otras formas de realización, el antígeno cancerígeno blanco para un ADC es sindecan–1 humano (CD138).

[0293] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena liviana, a saber: CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que consiste en SEQ ID NO:7, CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que consiste en SEQ ID NO:8, CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que consiste en SEQ ID NO:9; CDR1 de cadena liviana (LCDR1) que consiste en SEQ ID NO:10, CDR2 de cadena liviana (LCDR2) que consiste en SEQ ID NO:11, y CDR3 de cadena liviana (LCDR3) que consiste en SEQ ID NO:12, según se define por el sistema de numeración de Kabat.

[0294] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:21 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de SEQ ID NO:22, o secuencias que son al menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:21 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:22.

[0295] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG2a murina y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa murina. En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG2a humana y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0296] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:21 o una secuencia que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:21, y la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:22 o una secuencia que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:22. En formas de realización particulares, el anticuerpo anti–CD138 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:21 y la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:22, o secuencias que son al menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:21 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:22. En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 es B–B4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0297] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena liviana de B–B4 o en donde las CDR incluyen no más de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos de HCDR1 (SEQ ID NO:7), HCDR2 (SEQ ID NO:8), HCDR3 (SEQ ID NO:9); LCDR1 (SEQ ID NO:10), LCDR2 (SEQ ID NO:11) y LCDR3 (SEQ ID NO:12).

[0298] En diversas otras formas de realización, el antígeno cancerígeno blanco para un ADC es el receptor 2 de efrina tipo A humana (EPHA2).

[0299] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena liviana, a saber: CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que consiste en SEQ ID NO:13, CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que consiste en SEQ ID NO:14, CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que consiste en SEQ ID NO:15; CDR1 de cadena liviana (LCDR1) que consiste en SEQ ID NO:16, CDR2 de cadena liviana (LCDR2) que consiste en SEQ ID NO:17, y CDR3 de cadena liviana (LCDR3) que consiste en SEQ ID NO:18, según se define por el sistema de numeración de Kabat.

[0300] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:23 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de SEQ ID NO:24, o secuencias que son al menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:23 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:24.

[0301] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0302] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:23 o una secuencia que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:23, y la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:24 o una secuencia que es al menos 95% idéntica a SEQ ID NO:24. En formas de realización particulares, el anticuerpo anti–EPHA2 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO:23 y la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NO:24, o secuencias que son al menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:23 y una secuencia de aminoácidos de cadena liviana que es al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:23; y una cadena liviana codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:24. En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 es 1C1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0303] En diversas formas de realización, el anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las tres CDR de cadena pesada y tres CDR de

cadena liviana de 1C1 o en donde las CDR incluyen no más de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos de HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:14), HCDR3 (SEQ ID NO:15); LCDR1 (SEQ ID NO:16), LCDR2 (SEQ ID NO:17) y LCDR3 (SEQ ID NO:18).

[0304] En diversas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos son de residuos únicos. Las inserciones generalmente serán del orden de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, aunque se pueden aceptar inserciones considerablemente mayores en tanto se conserve la función biológica (por ejemplo, la unión a un antígeno blanco). Las deleciones generalmente oscilan de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, aunque en algunos casos las deleciones pueden ser mucho mayores. Se pueden usar sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para arribar a un derivado o variante final. Generalmente, estos cambios se realizan en algunos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, en particular la inmunogenicidad y la especificidad de la proteína de unión a antígeno. Sin embargo, se pueden aceptar cambios más grandes en ciertas circunstancias. Las sustituciones conservadoras generalmente se realizan de acuerdo con el siguiente cuadro mostrado como Tabla 6.

Tabla 6

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr

Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0305] Se realizan cambios sustanciales en la función o en la identidad inmunológica mediante la selección de sustituciones que son menos conservadoras que las que se muestran en la Tabla 6. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones que afecten de manera más significativa: la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la alteración, por ejemplo, la estructura alfa–helicoidal o de hoja beta; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco; o la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general pueden producir los mayores cambios en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que (a) un residuo hidrofílico, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por un residuo hidrofóbico, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye por cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

[0306] En diversas formas de realización en las que se usan secuencias de anticuerpos variantes en un ADC, las variantes exhiben típicamente la misma actividad biológica cualitativa y provocarán la misma respuesta inmune, aunque también se pueden seleccionar variantes para modificar las características de las proteínas de unión a antígeno según sea necesario. Alternativamente, la variante puede diseñarse de manera de alterar la actividad biológica de la proteína de unión a antígeno. Por ejemplo, los sitios de glucosilación pueden alterarse o eliminarse.

[0307] Pueden usarse diversos anticuerpos con los ADC utilizados en este documento para dirigirse a células cancerosas. Como se muestra a continuación, los enlazadores–cargas útiles en los ADC divulgados aquí son sorprendentemente efectivos con diferentes anticuerpos dirigidos contra el antígeno tumoral. Los antígenos adecuados expresados en células tumorales pero no en células sanas, o expresados en células tumorales a un nivel más alto que en células sanas, son conocidos en la técnica, al igual que los anticuerpos dirigidos contra ellos. Estos anticuerpos pueden usarse con los enlazadores y las cargas útiles del modulador de empalme divulgados en el presente documento. En algunas formas de realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se dirige a HER2, y el anticuerpo dirigido a HER2 o el fragmento de unión a antígeno es trastuzumab. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se dirige a CD138, y el anticuerpo dirigido a CD138 o el fragmento de unión a antígeno es B–B4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de

unión a antígeno se dirige a EPHA2, y el anticuerpo dirigido a EPHA2 o el fragmento de unión a antígeno es 1C1. En algunas formas de realización, aunque los enlazadores y las cargas útiles del modulador de empalme divulgados son sorprendentemente efectivos con varios anticuerpos dirigidos a tumores diferentes, los anticuerpos dirigidos a HER2 como trastuzumab, los anticuerpos dirigidos a CD138 como B–B4 y los anticuerpos dirigidos a EPHA2 como 1C1 proporcionaron una relación fármaco:anticuerpo particularmente mejorada, nivel de agregación, estabilidad (es decir, estabilidad *in vitro* e *in vivo*), direccionamiento tumoral (es decir, citotoxicidad, potencia) y/o eficacia del tratamiento. La eficacia mejorada del tratamiento se puede medir *in vitro* o *in vivo*, y puede incluir una tasa de crecimiento tumoral reducida y/o un volumen tumoral reducido.

[0308] En ciertas formas de realización, se usan anticuerpos alternativos para los mismos blancos o anticuerpos para diferentes blancos antigénicos y proporcionan al menos algunas de las propiedades funcionales favorables descritas anteriormente (por ejemplo, mejor estabilidad, mejor direccionamiento tumoral, mayor eficacia del tratamiento, etc.). En algunas formas de realización, algunas o todas estas propiedades funcionales favorables se observan cuando los enlazadores y las cargas útiles del modulador de empalme divulgados se conjugan con un anticuerpo dirigido a HER2, CD138 o EPHA2 alternativo, o un fragmento de unión a antígeno. En algunas otras formas de realización, algunas o todas estas propiedades funcionales favorables se observan cuando los enlazadores y las cargas útiles del modulador de empalme divulgados se conjugan con un anticuerpo dirigido a HER2 o un fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se dirige a HER2. En algunas formas de realización, el anticuerpo que se dirige a HER2 o el fragmento de unión a antígeno es trastuzumab. En algunas otras formas de realización, algunas o todas estas propiedades funcionales favorables se observan cuando los enlazadores y las cargas útiles del modulador de empalme divulgados se conjugan con un anticuerpo dirigido a CD138 o un fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se dirige a CD138. En algunas formas de realización, el anticuerpo dirigido a CD138 o el fragmento de unión a antígeno es B–B4. En algunas otras formas de realización, algunas o todas estas propiedades funcionales favorables se observan cuando los enlazadores y las cargas útiles del modulador de empalme divulgados se conjugan con un anticuerpo dirigido a EPHA2 o un fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se dirige a EPHA2. En algunas formas de realización, el anticuerpo dirigido a EPHA2 o el fragmento de unión a antígeno es 1C1.

<u>Enlazadores</u>

[0309] En diversas formas de realización, el enlazador en un ADC es estable extracelularmente de una manera suficiente para ser terapéuticamente eficaz. En algunas formas de realización, el enlazador es estable fuera de una célula, de modo que el ADC permanece intacto cuando está presente en condiciones extracelulares (por ejemplo, antes del transporte o la administración en una célula). El término "intacto", utilizado en el contexto de un ADC, significa que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno permanece unido al resto farmacológico (por ejemplo, el modulador de empalme). Tal como se usa en este documento, "estable", en el contexto de un enlazador o ADC que comprende un enlazador, significa que no más del 20%, no más de aproximadamente el 15%, no más de aproximadamente el 10%, no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 3% o no más de aproximadamente el 1% de los enlazadores (o cualquier porcentaje entre ellos) en una muestra de ADC se escinden (o, en el caso de un ADC general, no están intactos) cuando el ADC está presente en condiciones extracelulares. En algunas formas de realización, los enlazadores y/o ADC divulgados en el presente documento son sorprendentemente estables en comparación con enlazadores alternativos y/o ADC con enlazadores y/o cargas útiles de modulador de empalme alternativos. En algunas formas de realización, los ADC divulgados en este documento pueden permanecer intactos durante más de aproximadamente 48 horas, más de 60 horas, más de aproximadamente 72 horas, más de aproximadamente 84 horas o más de aproximadamente 96 horas.

[0310] Se puede determinar si un enlazador es estable extracelularmente, por ejemplo, incluyendo un ADC en plasma durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 16, 24, 48 o 72 horas) y luego cuantificando la cantidad de resto farmacológico libre presente en el plasma. La estabilidad puede permitirle al ADC tiempo para localizar las células tumorales blanco y evitar la liberación prematura del resto farmacológico, lo que podría disminuir el índice terapéutico del ADC al dañar indiscriminadamente tanto tejidos normales como tejidos tumorales. En algunas formas de realización, el enlazador es estable fuera de una célula blanco y libera el resto farmacológico desde el ADC una vez dentro de la célula, de manera que el fármaco puede unirse a su blanco (por ejemplo, al complejo de espliceosoma SF3b). Por lo tanto, un enlazador efectivo: (i) conservará las propiedades de unión específicas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno; (ii) permitirá la administración, por ejemplo, la administración intracelular, del resto farmacológico a través de la unión estable al anticuerpo o al fragmento de unión al antígeno; (iii) permanecerá estable e intacto hasta que el ADC haya sido transportado o entregado a su sitio blanco; y (iv) permitirá el efecto terapéutico, por ejemplo, el efecto citotóxico, del resto farmacológico después de la

escisión o un mecanismo de liberación alternativo.

[0311] Los enlazadores pueden afectar las propiedades físico–químicas de un ADC. Dado que muchos agentes citotóxicos son de naturaleza hidrófoba, su unión al anticuerpo con un resto hidrófobo adicional puede conducir a la agregación. Los agregados de ADC son insolubles y a menudo limitan la carga de fármaco alcanzable en el anticuerpo, lo que puede afectar negativamente la potencia del ADC. Los agregados proteicos de productos biológicos, en general, también se han relacionado con un aumento de la inmunogenicidad. Como se muestra a continuación, los enlazadores divulgados en este documento dan como resultado ADC con niveles de agregación bajos y niveles deseables de carga de fármaco.

[0312] Un enlazador puede ser "escindible" o "no escindible" (Ducry y Stump (2010) Bioconjugate Chem. 21:5–13). Los enlazadores escindibles están diseñados para liberar el resto farmacológico (por ejemplo, el modulador de empalme) cuando se someten a ciertos factores ambientales, por ejemplo, cuando se internalizan en la célula blanco, mientras que los enlazadores no escindibles generalmente dependen de la degradación del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno mismo.

[0313] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador no escindible. En algunas formas de realización, el resto farmacológico de modulador de empalme del ADC se libera por degradación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Los enlazadores no escindibles tienden a permanecer asociados covalentemente con al menos un aminoácido del anticuerpo y el fármaco tras la internalización y la degradación dentro de la célula blanco. Numerosos enlazadores no escindibles ejemplares se describen en el presente documento, y otros son conocidos en la técnica. Los enlazadores no escindibles ejemplares pueden comprender tioéter, ciclohexilo, N–succinimidil 4–(N–maleimidometil) ciclohexano–1 carboxilato (SMCC) o N–hidroxisuccinimida (NHS), uno o más restos de polietilenglicol (PEG), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos PEG, o uno o más restos alquilo.

[0314] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador escindible. Un enlazador escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto escindible. Tal como se usa en el presente documento, el término "resto escindible" se refiere a cualquier enlace químico que pueda ser escindido. Los enlaces químicos escindibles adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitaciones, enlaces lábiles ácidos, enlaces lábiles proteasa / peptidasa, enlaces fotolábiles, enlaces disulfuro y enlaces lábiles esterasa. Los enlazadores que comprenden un resto escindible pueden permitir la liberación del resto farmacológico de modulador de empalme desde el ADC a través de la escisión en un sitio particular en el enlazador.

[0315] En algunas formas de realización, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del enlazador libera suficientemente el resto farmacológico de modulador de empalme desde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en el entorno intracelular para activar el fármaco y/o hacer que el fármaco sea terapéuticamente eficaz. En algunas formas de realización, el resto farmacológico de modulador de empalme no se escinde desde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno hasta que el ADC ingresa en una célula que expresa un antígeno específico para el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del ADC, y el resto farmacológico de modulador de empalme se escinde del anticuerpo o fragmento de unión o antígeno al entrar en la célula. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto escindible que está posicionado de modo que ninguna parte del enlazador o el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno permanezca unida al resto farmacológico de modulador de empalme tras la escisión. Los enlazadores escindibles ejemplares incluyen enlazadores lábiles ácidos, enlazadores sensibles a proteasa / peptidasa, enlazadores fotolábiles, enlazadores que contienen dimetilo, disulfuro o sulfonamida.

[0316] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador sensible al pH, y es sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el enlazador sensible al pH es escindible en condiciones ácidas. Esta estrategia de escisión generalmente aprovecha el menor pH en los compartimentos intracelulares endosomales (pH ~5–6) y lisosomales (pH ~4.8), en comparación con el citosol (pH ~7.4), para desencadenar la hidrólisis de un grupo lábil ácido en el enlazador, como una hidrazona (Jain *et al.* (2015) Pharm Res 32:3526–40). En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador lábil ácido y/o hidrolizable. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil ácido que es hidrolizable en el lisosoma y que contiene un grupo lábil ácido (por ejemplo, una hidrazona, una semicarbazona, una tiosemicarbazona, una amida cis–aconítica, un ortoéster, un acetal, un cetal o similares). Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nros. 5.122.368, 5.824.805, 5.622.929; Dubowchik y Walker (1999) Pharm Therapeutics 83:67–123; Neville *et al.*(1989) Biol Chem. 264:14653–61. Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, como las de la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5.5 o 5.0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas formas de realización, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace de acilhidrazona) (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nro. 5.622.929).

[0317] En algunas formas de realización, el enlazador es escindible en condiciones reductoras. En algunas formas de realización, el enlazador es escindible en presencia de un agente reductor, tal como glutatión o ditiotreitol. En algunas formas de realización, el

enlazador es un enlazador disulfuro escindible o un enlazador sulfonamida escindible.

[0318] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador disulfuro escindible. Una variedad de enlazadores disulfuro son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N–succinimidil–5–acetiltioacetato), SPDP (N–succinimidil–3–(2–piridilditio)propionato), SPDB (N–succinimidil–3–(2–piridilditio)butirato) y SMPT (N–succinimidiloxicarbonil–alfa–metil–alfa–(2–piridil–ditio)tolueno), SPDB y SMPT. Véase, por ejemplo, Thorpe *et al.* (1987) Cancer Res. 47:5924–31; Wawrzynczak *et al.*, en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). Véase también la patente de EE. UU. Nro. 4.880.935. Los enlazadores disulfuro se utilizan normalmente para explotar la abundancia de tioles intracelulares, que pueden facilitar la escisión de sus enlaces disulfuro. Las concentraciones intracelulares del tiol intracelular de mayor abundancia, el glutatión reducido, generalmente están en el rango de 1–10 nM, que es aproximadamente 1.000 veces mayor que la del tiol de bajo peso molecular más abundante en la sangre (es decir, cisteína) en aproximadamente 5 µM (Goldmacher *et al.*, en Cancer Drug Discovery and Development: Antibody–Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips ed., Springer, 2013)). Las enzimas intracelulares de la familia de la proteína disulfuro isomerasa también pueden contribuir a la escisión intracelular de un enlazador disulfuro. Tal como se usa en el presente documento, un enlazador disulfuro escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto disulfuro escindible. El término "resto disulfuro escindible" se refiere a un enlace disulfuro que puede ser escindido y/o reducido, por ejemplo, por un tiol o una enzima.

[0319] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador de sulfonamida escindible. Tal como se usa en este documento, un enlazador de sulfonamida escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto sulfonamida escindible. El término "resto sulfonamida escindible" se refiere a un grupo sulfonamida, es decir, un grupo sulfonilo conectado a un grupo amina, en donde el enlace azufre–nitrógeno se puede escindir.

[0320] En algunas formas de realización, el enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto farmacológico a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un resto enlazador multifuncional de ramificación. Véase, por ejemplo, Sun *et al.* (2002) Bioorg Med Chem Lett. 12:2213–5; Sun *et al.* (2003) Bioorg Med Chem. 11:1761–8. Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco a anticuerpo, es decir, la carga del fármaco, que está relacionada con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno lleva solo un grupo reactivo de cisteína tiol, por ejemplo, una multitud de

restos farmacológicos moduladores de empalme pueden unirse a través de un enlazador dendrítico. En algunas formas de realización, el resto enlazador o el resto enlazador–fármaco se puede unir al anticuerpo o al fragmento de unión a antígeno mediante química reducida de puentes de disulfuro o tecnología de utilización limitada de lisina. Véase, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nros. WO 2013/173391 y WO 2013/173393.

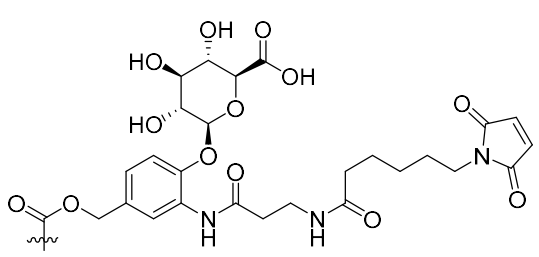
[0321] En algunas formas de realización, el enlazador es escindible por un agente de escisión, por ejemplo, una enzima, que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador peptídico que es escindido por una peptidasa o enzima proteasa intracelular, que incluye, entre otras, una proteasa lisosomal o endosomal.

[0322] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador peptídico escindible. Tal como se usa en el presente documento, un enlazador peptídico escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto peptídico escindible. El término "resto peptídico escindible" se refiere a cualquier enlace químico que une aminoácidos (derivados de aminoácidos naturales o sintéticos) que puede ser escindido por un agente que está presente en el entorno intracelular. Por ejemplo, un enlazador puede comprender una secuencia de valina–alanina (Val–Ala), o una secuencia de valina–citrulina (Val–Cit) que es escindible por una peptidasa tal como catepsina, por ejemplo, catepsina B. En algunas formas de realización, un enlazador puede comprender una secuencia de ácido glutámico–valina–citrulina (Glu–Val–Cit). En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador escindible por enzimas y un resto peptídico escindible en el enlazador es escindible por la enzima. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible es escindible por una enzima lisosomal, por ejemplo, catepsina. En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador escindible por catepsina. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible en el enlazador es escindible por una cisteína catepsina lisosomal, tal como catepsina B, C, F, H, K, L, O, S, V, X o W. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible es escindible por catepsina B. Un dipéptido ejemplar que puede ser escindido por catepsina B es valina–citrulina (Val–Cit) (Dubowchik *et al.* (2002) Bioconjugate Chem. 13:855–69).

[0323] En algunas formas de realización, el enlazador o el resto peptídico escindible en el enlazador comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácidos permite la escisión del enlazador por una proteasa, facilitando así la liberación del resto farmacológico de modulador de empalme desde el ADC tras la exposición a una o más proteasas intracelulares, tales como una o más enzimas lisosomales (Doronina *et al.* (2003) Nat Biotechnol. 21:778–84; Dubowchik y Walker (1999) Pharm Therapeutics 83:67–123). Las unidades de aminoácidos ejemplares

incluyen, pero sin limitaciones, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Los dipéptidos ejemplares incluyen, pero sin limitaciones, valina–alanina (Val–Ala), valina–citrulina (Val–Cit), alanina–asparagina (Ala–Asn), alanina–fenilalanina (Ala–Phe), fenilalanina–lisina (Phe–Lys), alanina–lisina (Ala–Lys), alanina–valina (Ala–Val), valina–lisina (Val–Lys), lisina–lisina (Lys–Lys), fenilalanina–citrulina (Phe–Cit), leucina–citrulina (Leu–Cit), isoleucina–citrulina (Ile–Cit), triptófano–citrulina (Trp–Cit) y fenilalanina–alanina (Phe–Ala). Los ejemplos de tripéptidos incluyen, pero sin limitaciones, alanina–alanina–asparagina (Ala–Ala–Asn), glicina–valina–citrulina (Gly–Val–Cit), glicina–glicina–glicina (Gly–Gly–Gly), fenilalanina–fenilalanina–lisina (Phe–Phe–Lys), ácido glutámico–valina–citrulina (Glu–Val–Cit) (véase, por ejemplo, Anami *et al.* (2018) Nat Comm. 9:2512, que se incorpora aquí por referencia para enlazadores ejemplares que comprenden Glu–Val–Cit), y glicina–fenilalanina–lisina (Gly–Phe–Lys). Otras unidades de aminoácidos ejemplares incluyen, pero sin limitaciones, Gly–Phe–Gly–Gly (SEQ ID NO:34), Gly–Phe–Leu–Gly (SEQ ID NO:35), Ala–Leu–Ala–Leu (SEQ ID NO:36), Phe–N^9–tosil–Arg y Phe–N^9–Nitro–Arg, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. Nro. 6.214.345. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido en el enlazador comprende Val–Ala. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido en el enlazador comprende Val–Cit. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido en el enlazador comprende Glu–Val–Cit. Una unidad de aminoácido puede comprender residuos de aminoácidos que se producen de forma natural y/o aminoácidos menores y/o análogos de aminoácidos no naturales, como la citrulina. Las unidades de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, una proteasa lisosomal como catepsina B, C, D o S, o una proteasa plasmina.

[0324] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador de β–glucurónido escindible. Tal como se usa en este documento, un enlazador de β–glucurónido escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto de β–glucurónido escindible. Un enlazador de β–glucurónido escindible ejemplar comprende la estructura:



[0325] El término “resto β–glucuronida escindible” se refiere a un enlace glucosídico que puede ser escindido por un agente actividad de β–glucuronidasa. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un enlace glucosídico que puede

ser escindido por una β–glucuronidasa. Una β–glucuronidasa es una UDP–glucuronosil transferasa que cataliza la hidrólisis del enlace glucosídico de glucurónidos con configuración β.

[0326] En algunas formas de realización, un ADC divulgado en la presente comprende un resto β–glucuronida escindible en el enlazador que es escindible por la enzima. En algunas formas de realización, el resto β–glucuronida escindible en el enlazador es escindible por una enzima lisosomal, por ejemplo, una β–glucuronidasa. En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador de β–glucuronidasa escindible. En algunas formas de realización, el resto β–glucuronida escindible en el enlazador permite la escisión del enlazador por una β–glucuronidasa luego de la internalización del ADC, con lo cual facilita la liberación del resto farmacológico desde el ADC en el entorno celular.

[0327] En algunas formas de realización, el enlazador en cualquiera de los ADC divulgados en la presente puede comprender al menos una unidad espaciadora que une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno al resto farmacológico (por ejemplo, el resto farmacológico de modulador de empalme). En algunas formas de realización, una unidad espaciadora entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el resto escindible, cuando está presente, une un sitio de escisión (por ejemplo, un resto peptídico escindible) en el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, una unidad espaciadora entre el resto farmacológico y el resto escindible, cuando está presente, une un sitio de escisión (por ejemplo, un resto peptídico escindible) en el enlazador con el resto farmacológico. En algunas formas de realización, no hay ningún sitio de escisión presente, y la unidad espaciadora se usa para unir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico.

[0328] En algunas formas de realización, el enlazador, y/o la unidad espaciadora en el enlazador, es sustancialmente hidrófilo. Un enlazador hidrófilo se puede usar para reducir el grado en el que el fármaco se puede bombear fuera de las células cancerosas resistentes a través de múltiples transportadores de resistencia farmacológica (MDR) o transportadores funcionalmente similares. En algunas formas de realización, un enlazador hidrófilo puede incluir uno o más restos de polietilenglicol (PEG), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos PEG. En algunas formas de realización, el enlazador comprende 2 restos PEG.

[0329] En algunas formas de realización, la unidad espaciadora en el enlazador comprende uno o más restos PEG. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende uno o más $–(PEG)_m–$, y m es un número entero de 1 a 10 (es decir, m puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10). En algunas formas de realización, m oscila de 1 a 10; de 2 a 8; de 2 a 6; de 2 a 5; de 2 a 4; o de 2 a 3. En algunas formas de realización, m es 2. En

algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende $(PEG)_2$, $(PEG)_3$, $(PEG)_4$, $(PEG)_5$, $(PEG)_6$, $(PEG)_7$, $(PEG)_8$, $(PEG)_9$ o $(PEG)_{10}$. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende $(PEG)_2$.

[0330] En algunas formas de realización, la unidad espaciadora en el enlazador comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende uno o más $–(CH_2)_n–$, y *n* es un número entero de 1 a 10 (es decir, *n* puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10). En algunas formas de realización, *n* oscila de 1 a 10; de 2 a 8; de 2 a 6; de 2 a 5; de 2 a 4; o de 2 a 3. En algunas formas de realización, *n* es 2. En algunas formas de realización, *n* es 5. En algunas formas de realización, *n* es 6. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$, $(CH_2)_4$, $(CH_2)_5$, $(CH_2)_6$, $(CH_2)_7$, $(CH_2)_8$, $(CH_2)_9$ o $(CH_2)_{10}$. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende $(CH_2)_2$ (“Et”). En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende $(CH_2)_6$ (“Hex”). En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende $(CH_2)_2–O–(CH_2)_2$ (“Et–O–Et”).

[0331] Una unidad espaciadora se puede usar, por ejemplo, para unir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico, ya sea directa o indirectamente. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico de modulador de empalme directamente. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el resto farmacológico de modulador de empalme están unidos a través de una unidad espaciadora que comprende uno o más restos PEG (por ejemplo, $(PEG)_2$), o uno o más restos alquilo (por ejemplo, $(CH_2)_2$, $(CH_2)_6$ o $(CH_2)_2–O–(CH_2)_2$). En algunas formas de realización, la unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico de modulador de empalme indirectamente. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico de modulador de empalme indirectamente a través de un resto escindible (por ejemplo, un péptido escindible o una β–glucuronida escindible) y/o un resto de unión para unir la unidad espaciadora con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, un resto maleimida.

[0332] La unidad espaciadora, en diversas formas de realización, se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (es decir, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) a través de un resto maleimida (Mal).

[0333] Una unidad espaciadora que se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de una Mal se denomina en la presente “Mal–unidad espaciadora”. El término “Mal” o “resto maleimida,” tal como se usa en la presente, significa un compuesto que contiene un grupo maleimida y que es reactivo con un grupo sulfhidrilo,

por ejemplo, un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Otros grupos funcionales que son reactivos con grupos sulfhidrilo (tioles) incluyen, pero sin limitaciones, iodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, piridil disulfuro, isocianato e isotiocianato. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora es reactiva con un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través del residuo de cisteína. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto PEG. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un resto alquilo.

[0334] En ciertas formas de realización, el enlazador comprende la Mal–unidad espaciadora y un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido comprende Val–Cit. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido comprende Val–Ala. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido comprende Glu–Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende la Mal–unidad espaciadora y Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende la Mal–unidad espaciadora y Val–Ala. En algunas formas de realización, el enlazador comprende la Mal–unidad espaciadora y Val–Cit, en donde la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la Mal–unidad espaciadora y Val–Ala, en donde la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la Mal–unidad espaciadora y un resto β–glucuronida escindible.

[0335] En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–unidad espaciadora. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: MC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–$(CH_2)_2$ (“Mal–Et”). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–$(CH_2)_6$ (“Mal–Hex”). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–$(CH_2)_2$–O–$(CH_2)_2$ (“Mal–Et–O–Et”). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–$(PEG)_2$. En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–$(PEG)_2$–CO.

[0336] En diversas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–unidad espaciadora–péptido. En

algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–unidad espaciadora–Val–Cit. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: MC–Val–Cit.

[0337] En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: Mal–unidad espaciadora–Val–Ala. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende la estructura: MC–Val–Ala.

[0338] En diversas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con un resto β–glucuronida escindible. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–unidad espaciadora–β–glucuronida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–β–glucuronida.

[0339] En diversas formas de realización, el resto escindible en el enlazador se une directamente con el resto farmacológico de modulador de empalme. En otras formas de realización, una unidad espaciadora se usa para unir el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme resto farmacológico. En diversas formas de realización, el modulador de empalme se une con el resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora.

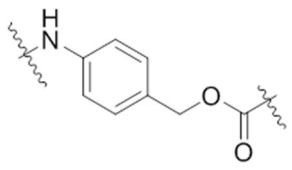
[0340] Una unidad espaciadora puede ser "auto–inmolante" o "no auto–inmolante", Una unidad espaciadora "no auto–inmolante" es aquella en la cual parte o toda la unidad espaciadora permanece unida al resto farmacológico de modulador de empalme tras la escisión del enlazador. Los ejemplos de unidades espaciadoras no auto–inmolantes incluyen, pero sin limitaciones, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina–glicina. Las unidades espaciadoras no auto–inmolantes finalmente pueden degradarse en el tiempo, pero no liberan fácilmente un resto farmacológico nativo unido enteramente en condiciones celulares. Una unidad espaciadora “auto–inmolante” permite la liberación del resto farmacológico nativo en condiciones intracelulares. Un “fármaco nativo” o “resto farmacológico nativo” es aquel en el cual ninguna parte de la unidad espaciadora u otra modificación química permanece tras la escisión / degradación de la unidad espaciadora.

[0341] La química de auto–inmolación es conocida en el arte y puede seleccionarse fácilmente para los ADC divulgados. En diversas formas de realización, la unidad espaciadora que une el resto escindible en el enlazador al resto farmacológico de modulador de empalme es auto–inmolante, y sufre auto–inmolación concurrentemente o poco antes / después de la escisión del resto escindible en condiciones intracelulares. En

algunas formas de realización, el modulador de empalme se une al resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora auto–inmolante. En ciertas formas de realización, el modulador de empalme se une al resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora auto–inmolante, el resto escindible comprende Val–Cit, y un maleimidocaproílo (MC) une el resto escindible con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En ciertas formas de realización, el modulador de empalme se une con el resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora auto–inmolante, el resto escindible comprende Val–Ala, y un maleimidocaproílo (MC) une el resto escindible con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En ciertas formas de realización, el modulador de empalme se une con el resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora auto–inmolante, el resto escindible comprende Glu–Val–Cit, y un maleimidocaproílo (MC) une el resto escindible con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En ciertas formas de realización, el modulador de empalme se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de una Mal–unidad espaciadora (por ejemplo, MC) en el enlazador unido con un resto escindible Val–Cit y una unidad espaciadora auto–inmolante pABC o pAB. En ciertas otras formas de realización, el modulador de empalme se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de una Mal–unidad espaciadora (por ejemplo, MC) en el enlazador unido con un resto escindible Val–Ala y una unidad espaciadora auto–inmolante pABC o pAB. En ciertas otras formas de realización, el modulador de empalme se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de una Mal–unidad espaciadora (por ejemplo, MC) en el enlazador unido con un resto escindible Glu–Val–Cit y una unidad espaciadora auto–inmolante pABC o pAB.

[0342] En ciertas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante en el enlazador comprende una unidad de p–aminobencilo. En algunas formas de realización, un alcohol p–aminobencilo (pABOH) se une con una unidad de aminoácido u otro resto escindible en el enlazador a través de un enlace amida, y se forma un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el pABOH y el resto farmacológico (Hamann *et al.* (2005) Expert Opin Ther Patents 15:1087–103). En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante es o comprende p–aminobenciloxicarbonilo (pABC). Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la autoinmolación de pABC implica una reacción espontánea de 1,6–eliminación (Jain *et al.* (2015) Pharm Res. 32:3526–40).

[0343] En diversas formas de realización, la estructura del p–aminobenciloxicarbonilo (pABC) usado en los ADC divulgados se muestra a continuación:



[0344] En diversas formas de realización, la unidad espaciadora autoinmolante une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante es pABC. En algunas formas de realización, la pABC une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, la pABC sufre auto–inmolación tras la escisión del resto escindible, y el modulador de empalme es liberado del ADC en su forma activa nativa.

[0345] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC. En otras formas de realización, un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Ala–pABC.

[0346] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC. En otras formas de realización, un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Ala–pABC.

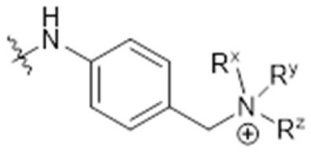
[0347] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC. En otras formas de realización, un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Ala–pABC.

[0348] En algunas formas de realización, la pABC sufre auto–inmolación tras la escisión de un resto peptídico escindible en el enlazador. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el enlazador comprende unidad de aminoácido–pABC. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Val–Ala. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pABC. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Glu–Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Glu–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Ala–Ala–Asn. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Ala–Ala–Asn–pABC.

[0349] En algunas formas de realización, la pABC sufre auto–inmolación tras la escisión de un resto β–glucuronida escindible en el enlazador. En algunas formas de realización, el enlazador comprende β–glucuronida–pABC.

[0350] En ciertas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante en el enlazador comprende una unidad de p–aminobencilo. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante en el enlazador comprende un p–aminobencilo (pAB). En algunas formas de realización, la auto–inmolación de pAB implica una reacción espontánea de 1,6–eliminación.

[0351] En diversas formas de realización, la estructura del p–aminobencilo (pAB) usado en los ADC divulgados se muestra a continuación:



[0352] En diversas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante es pAB. En algunas formas de realización, el pAB une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, el pAB sufre auto–inmolación tras la escisión del resto escindible, y el modulador de empalme es liberado del ADC en su forma activa nativa.

[0353] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pAB. En otras formas de realización, un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Ala–pAB.

[0354] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pAB. En otras formas de realización, un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Ala–pAB.

[0355] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pAB. En otras formas de realización, un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno se une al modulador de empalme por un enlazador que comprende MC–Val–Ala–pAB.

[0356] En algunas formas de realización, el pAB sufre auto–inmolación tras la escisión de un resto peptídico escindible en el enlazador. En algunas formas de

realización, el resto peptídico escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el enlazador comprende unidad de aminoácido–pAB. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pAB. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Val–Ala. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pAB. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Glu–Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Glu–Val–Cit–pAB. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido es Ala–Ala–Asn. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Ala–Ala–Asn–pAB.

[0357] En algunas formas de realización, el pAB sufre auto–inmolación tras la escisión de un resto β–glucuronida escindible en el enlazador. En algunas formas de realización, el enlazador comprende β–glucuronida–pAB.

[0358] En algunas otras formas de realización, el modulador de empalme se une con el resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora no auto–inmolante. En ciertas formas de realización, el modulador de empalme se une con el resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora no auto–inmolante, el resto escindible comprende Val–Cit, y un maleimidocaproílo (MC) une el resto escindible con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En ciertas formas de realización, el modulador de empalme se une con el resto escindible en el enlazador por una unidad espaciadora no auto–inmolante, el resto escindible comprende Val–Ala, y un maleimidocaproílo (MC) une el resto escindible con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

[0359] En diversos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC se conjuga con el resto farmacológico de modulador de empalme a través de un enlazador, en donde el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora (por ejemplo, MC), una unidad de aminoácido escindible y un pABC. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–unidad espaciadora–unidad de aminoácido–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–unidad de aminoácido–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Glu–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Ala–Ala–Asn–pABC.

[0360] En diversos otros aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC se conjuga con el resto farmacológico de modulador de empalme a través de un enlazador, en donde el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora (por ejemplo,

MC), una unidad de aminoácido escindible y un pAB. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende un resto alquilo. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–unidad espaciadora–unidad de aminoácido–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–unidad de aminoácido–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Glu–Val–Cit–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Ala–Ala–Asn–pAB.

[0361] En diversos otros aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC se conjuga con el resto farmacológico de modulador de empalme a través de un enlazador, en donde el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora (por ejemplo, MC), una β–glucuronida escindible y un pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–unidad espaciadora–β–glucuronida–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–β–glucuronida–pABC.

[0362] En incluso otros aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del ADC se conjuga con el resto farmacológico de modulador de empalme a través de un enlazador, en donde el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora (por ejemplo, MC), una β–glucuronida escindible y un pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–unidad espaciadora–β–glucuronida–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–β–glucuronida–pAB.

[0363] En diversas formas de realización, el compuesto ADC tiene la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que apunta a una célula neoplásica;

D es un modulador de empalme;

L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0364] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (Ab) del ADC se conjuga con el resto farmacológico de modulador de empalme a través de un enlazador, en donde el enlazador es cualquiera de los enlazadores divulgados o incorporados por referencia en la presente, o comprende uno o más componentes de cualquiera de los enlazadores divulgados o incorporados por referencia en la presente.

[0365] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto escindible que está posicionado de manera tal que ninguna parte del enlazador o el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno permanece unida al modulador de empalme

luego de la escisión. En algunas formas de realización, el resto escindible es un resto peptídico escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácido tal como Val–Cit o Val–Ala. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido o enlazador comprende Val–Cit. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido o enlazador comprende Val–Ala. En algunas formas de realización, la unidad de aminoácido o enlazador comprende Glu–Val–Cit.

[0366] En algunas formas de realización, el enlazador comprende al menos una unidad espaciadora que une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto escindible. En algunas formas de realización, el enlazador comprende al menos una unidad espaciadora que une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora o enlazador comprende al menos un resto alquilo.

[0367] En algunas formas de realización, una unidad espaciadora en el enlazador se une con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un resto Mal ("Mal–unidad espaciadora"). En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora comprende al menos un resto alquilo. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un maleimidocaproílo (MC). En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–$(CH_2)_2$ ("Mal–Et"). En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–$(CH_2)_6$ ("Mal–Hex"). En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–$(CH_2)_2$–O–$(CH_2)_2$ ("Mal–Et–O–Et"). En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–$(PEG)_2$–CO. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico.

[0368] En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(PEG)_2$, Mal–$(PEG)_3$, Mal–$(PEG)_4$, Mal–$(PEG)_5$, Mal–$(PEG)_6$, Mal–$(PEG)_7$ o Mal–$(PEG)_8$. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(PEG)_2$. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(PEG)_2$–CO, Mal–$(PEG)_3$–CO, Mal–$(PEG)_4$–CO, Mal–$(PEG)_5$–CO, Mal–$(PEG)_6$–CO, Mal–$(PEG)_7$–CO o Mal–$(PEG)_8$–CO. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(PEG)_2$–CO. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(PEG)_2$–CO y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, la Mal–$(PEG)_2$–CO une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico. En algunas formas de realización, el enlazador comprende o consiste en Mal–$(PEG)_2$–CO. Un ejemplo de un enlazador "Mal–$(PEG)_2$–CO" también se denomina en la presente "ADL2" o un enlazador "ADL2".

[0369] En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende MC. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende MC y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el MC une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico. En algunas formas de realización, el enlazador comprende o consiste en MC. Un ejemplo de un enlazador "MC" también se denomina en la presente "ADL10" o un enlazador "ADL10".

[0370] En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(CH_2)_6$ ("Mal–Hex"). En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–Hex y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el Mal–Hex une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–Hex. Un ejemplo de un enlazador "Mal–Hex" también se denomina en la presente "ADL12" o un enlazador "ADL12".

[0371] En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(CH_2)_2$ ("Mal–Et"). En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–Et y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el Mal–Et une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–Et. Un ejemplo de un enlazador "Mal–Et" también se denomina en la presente "ADL14" o en enlazador "ADL14".

[0372] En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–$(CH_2)_2$–O–$(CH_2)_2$ ("Mal–Et–O–Et"). En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende Mal–Et–O–Et y al menos una unidad espaciadora adicional. En algunas formas de realización, el Mal–Et–O–Et une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto farmacológico. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Mal–Et–O–Et. Un ejemplo de un enlazador "Mal–Et–O–Et" también se denomina en la presente "ADL15" o un enlazador "ADL15".

[0373] En algunas otras formas de realización, la Mal–unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con el resto escindible en el enlazador. En algunas formas de realización, el resto escindible en el enlazador es un resto peptídico escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el resto peptídico escindible es Val–Cit o Val–Ala. En algunas formas de realización, la Mal–unidad espaciadora o enlazador comprende MC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–

Glu–Val–Cit. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Ala–Ala–Asn.

[0374] En algunas formas de realización, una unidad espaciadora une el resto escindible en el enlazador al modulador de empalme. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora que une el resto escindible con el modulador de empalme es auto–inmolante.

[0375] En algunas formas de realización, la unidad espaciadora comprende pABC. En algunas formas de realización, el pABC une el resto escindible con el modulador de empalme. En algunas formas de realización, el resto escindible es un resto peptídico escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el enlazador comprende unidad de aminoácido–pABC.

[0376] En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pABC y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit–pABC y al menos una unidad espaciadora adicional. Un ejemplo de un enlazador MC–Val–Cit–pABC también se denomina en la presente “ADL1” o un enlazador “ADL1”.

[0377] En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pABC y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala–pABC y al menos una unidad espaciadora adicional. Un ejemplo de un enlazador MC–Val–Ala–pABC también se denomina en la presente “ADL6” o un enlazador “ADL6”.

[0378] En algunas formas de realización, el enlazador comprende Glu–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Glu–Val–Cit–pABC y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Glu–Val–Cit–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Glu–Val–Cit–pABC y al menos una unidad espaciadora adicional. Un ejemplo de un enlazador MC–Glu–Val–Cit–pABC también se denomina en la presente “ADL23” o un enlazador “ADL23”.

[0379] En algunas formas de realización, el enlazador comprende Ala–Ala–Asn–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Ala–Ala–Asn–pABC y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Ala–Ala–Asn–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Ala–Ala–Asn–pABC y

al menos una unidad espaciadora adicional. Un ejemplo de un enlazador MC–Ala–Ala–Asn–pABC también se denomina en la presente “ADL21” o un enlazador “ADL21”.

[0380] En algunas otras formas de realización, la unidad espaciadora comprende pAB. En algunas formas de realización, el pAB une el resto escindible con el modulador de empalme. En algunas formas de realización, el resto escindible es un resto peptídico escindible, por ejemplo, una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, el enlazador comprende unidad de aminoácido–pAB.

[0381] En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Ala–pAB y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Ala–pAB y al menos una unidad espaciadora adicional. Un ejemplo de un enlazador MC–Val–Ala–pAB también se denomina en la presente “ADL5” o un enlazador “ADL5”.

[0382] En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende Val–Cit–pAB y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–Val–Cit–pAB y al menos una unidad espaciadora adicional. Un ejemplo de un enlazador MC–Val–Cit–pAB también se denomina en la presente “ADL7” o un enlazador “ADL7”.

[0383] En algunas formas de realización, el enlazador comprende β–glucuronida–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende β–glucuronida–pABC y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–β–glucuronida–pABC. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–β–glucuronida–pABC y al menos una unidad espaciadora adicional. Un ejemplo de una MC–β–glucuronida–pABC también se denomina en la presente “ADL13” o un enlazador “ADL13”.

[0384] En algunas formas de realización, el enlazador comprende β–glucuronida–pAB. En algunas formas de realización, el enlazador comprende β–glucuronida–pAB y una MC Mal–unidad espaciadora que une el enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el enlazador comprende MC–β–glucuronida–pAB.

[0385] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con el resto farmacológico de modulador de empalme a través de un

enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15. Se ha descubierto, en diversas formas de realización, que los ADC que comprenden un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 y un resto farmacológico de modulador de empalme divulgados en la presente demuestran propiedades deseables para un ADC terapéuticos. En diversas formas de realización, estas propiedades incluyen, pero sin limitaciones, niveles efectivos de carga de fármaco, bajos niveles de agregación, estabilidad en condiciones de almacenamiento o en circulación en el cuerpo (por ejemplo, estabilidad en suero), afinidad conservada para células que expresan el blanco comparable con el anticuerpo no conjugado, citotoxicidad potente contra células que expresan el blanco, bajos niveles de destrucción celular fuera del blanco, altos niveles de destrucción adicional, y/o actividad antineoplásica *in vivo* efectiva, todo en comparación con ADC que usan otros enlazadores–cargas útiles. Por ejemplo, en diversas formas de realización, los ADC que comprenden un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 y un resto farmacológico de modulador de empalme divulgado en la presente exhiben mayor capacidad para inhibir el crecimiento y/o la proliferación en células que expresan el blanco, en comparación con ADC que usan otros enlazadores–cargas útiles (por ejemplo, un enlazador ADL10 y un resto farmacológico de modulador de empalme). En diversas formas de realización, los ADC que comprenden un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 y un resto farmacológico de modulador de empalme divulgado en la presente exhiben estabilidad *in vivo* sorprendentemente mayor (por ejemplo, estabilidad en plasma), en comparación con otros ADC basados en moduladores de empalme (por ejemplo, un ADC basado en tailanstatina A, por ejemplo, como se reporta en Puthenveetil *et al.* Bioconjugate Chem. (2016) 27:1880–8).

[0386] En algunas formas de realización, las propiedades funcionales buenas o superiores proporcionadas por la combinación particular de un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 y un resto farmacológico de modulador de empalme divulgado en la presente se pueden observar con el enlazador–carga útil conjugado con, por ejemplo, un anticuerpo anti–HER2 tal como trastuzumab; un anticuerpo anti–CD138 tal como B–B4; o un anticuerpo anti–EPHA2 tal como 1C1.

[0387] En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL1–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL2–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL5–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL6–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL7–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL12–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL13–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL14–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL15–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que conserva la capacidad para apuntar e internalizarse en una célula neoplásica.

[0388] En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL1–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL2–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL5–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL6–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula

neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL7–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL12–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL13–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL14–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL15–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2.

[0389] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2 es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2 comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3).

[0390] En algunas formas de realización, el ADC tiene la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde:

(i) Ab es un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3);

(ii) D es un modulador de empalme;

(iii) L es un enlazador que comprende ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15; y

(iv) *p* es un número entero de 1 a 15.

[0391] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa HER2 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo es trastuzumab. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 1 a 10, de 2 a 8, o de 4 a 8. En algunas formas de realización, *p* es 4. En algunas formas de realización, *p* es 8.

[0392] En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL1–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL2–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL5–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL6–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL7–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL12–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL13–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL14–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL15–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138.

[0393] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138 es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que

apunta a una célula neoplásica que expresa CD138 comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3).

[0394] En algunas formas de realización, el ADC tiene la Fórmula (I):

$$Ab–(L–D)_p \qquad (I)$$

en donde:

(i) Ab es un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3);

(ii) D es un modulador de empalme;

(iii) L es un enlazador que comprende ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15; y

(iv) *p* es un número entero de 1 a 15.

[0395] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG2a murino y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa murino. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa CD138 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG2a humana y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo es B–B4. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 1 a 10, de 2 a 8, o de 4 a 8. En algunas formas de realización, *p* es 4. En algunas formas de realización, *p* es 8.

[0396] En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL1–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende

ADL2–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL5–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL6–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL7–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL12–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL13–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL14–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el ADC comprende ADL15–modulador de empalme y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2.

[0397] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2 es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión a antígeno internalizante. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2 comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3).

[0398] En algunas formas de realización, el ADC tiene la Fórmula (I):

$$Ab–(L–D)_p \qquad (I)$$

en donde:

(i) Ab es un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de

complementariedad de cadena liviana (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3);

(ii) D es un modulador de empalme;

(iii) L es un enlazador que comprende ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15; y

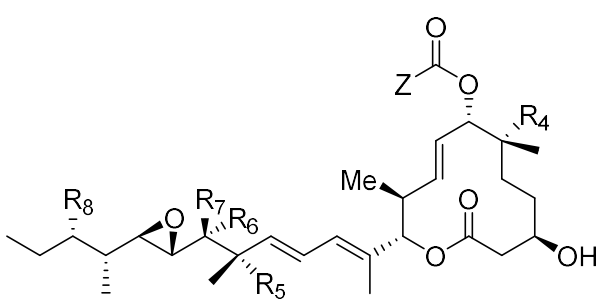
(iv) *p* es un número entero de 1 a 15.

[0399] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que apunta a una célula neoplásica que expresa EPHA2 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena liviana de Ig kappa humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo es 1C1. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 1 a 10, de 2 a 8, o de 4 a 8. En algunas formas de realización, *p* es 4. En algunas formas de realización, *p* es 8.

Restos farmacológicos

[0400] El resto farmacológico (D) de los ADC descritos en la presente puede ser cualquier agente quimioterapéutico. Las clases de agentes quimioterapéuticos útiles incluyen, por ejemplo, moduladores de empalme de ARN. En ciertas formas de realización preferidas, el resto farmacológico es un modulador de empalme. Los compuestos moduladores de empalme ejemplares se describen y ejemplifican en la presente.

[0401] En diversas formas de realización, el resto farmacológico es un compuesto modulador de empalme de Fórmula (II):



(II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

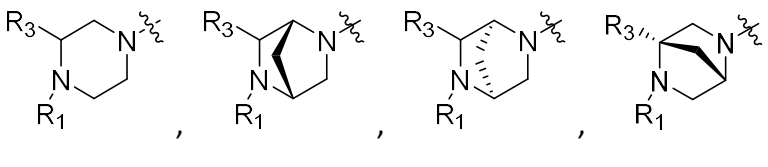
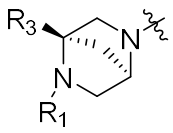
R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, –O–R^{17}, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6 y –$NR^{15}R^{16}$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17};

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

Z se selecciona de  , y  ;

en donde R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), –$NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8,

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno.

[0402] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

[0403] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno.

En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

[0404] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

[0405] En algunas formas de realización, R^5 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^5 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^5 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^5 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^5 es un grupo alquilo C1–C4.

[0406] En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–OR^{17}$, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, $–C(=O)–R^{17}$ y $–C(=O)–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, $–C(=O)–R^{17}$ y $–C(=O)–O–R^{17}$, y en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^6 es $–NR^{15}R^{16}$. En algunas formas de realización, R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^7 es $–O–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo

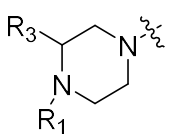
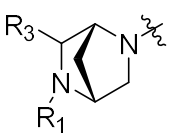
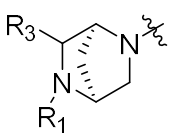
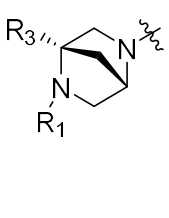
C1–C6. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^7 es $–NR^{15}R^{16}$.

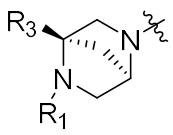
[0407] En algunas formas de realización, R^8 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y (alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo hidroxilo. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1).

[0408] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es $–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^{15} es $–C(=O)–O–R^{17}$.

[0409] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es $–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^{16} es $–C(=O)–O–R^{17}$.

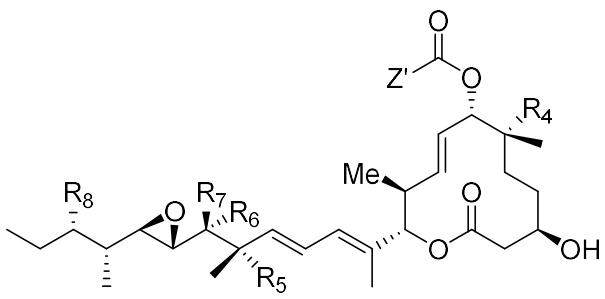
[0410] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

[0411] En algunas formas de realización, Z es  . En algunas formas de realización, Z es  . En algunas formas de realización, Z es  . En algunas formas de realización, Z es  . En algunas formas de realización, Z es

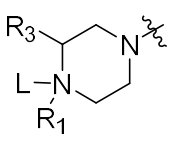
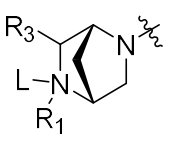
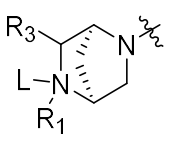
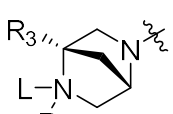
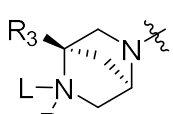


.

[0412] En algunas formas de realización, el compuesto modulador de empalme de Fórmula (II) se une al enlazador L, por ejemplo, en un ADC de Fórmula (I), como se muestra en la Fórmula (II–A):

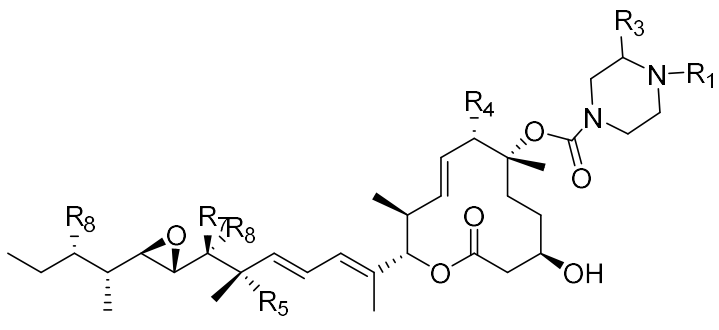


(II–A),

en donde Z' se selecciona de  ,  ,  ,  ,  ; y

en donde todas las demás variables son como se definen para la Fórmula (II).

[0413] En diversas otras formas de realización, el resto farmacológico es un compuesto modulador de empalme de Fórmula (IV):



(IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos

hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, –O–R^{17}, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6 y –$NR^{15}R^{16}$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), –$NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8,

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno.

[0414] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

[0415] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

[0416] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo

alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

[0417] En algunas formas de realización, R^5 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^5 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^5 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^5 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^5 es un grupo alquilo C1–C4.

[0418] En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –OR^{17}, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –$NR^{15}R^{16}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –$NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –$NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}, y en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es –O–C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^6 es –$NR^{15}R^{16}$.

[0419] En algunas formas de realización, R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^7 es –O–C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^7 es –$NR^{15}R^{16}$.

[0420] En algunas formas de realización, R^8 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y (alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo hidroxilo. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1).

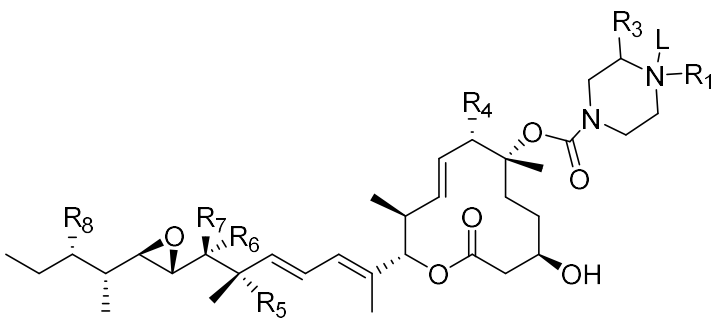
[0421] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–R^{17}. En algunas

formas de realización, R^{15} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0422] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–O–R^{17}.

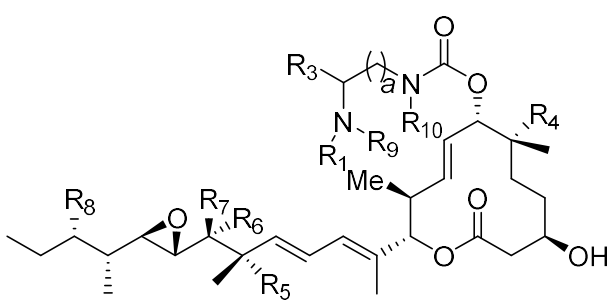
[0423] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

[0424] En algunas formas de realización, el compuesto modulador de empalme de Fórmula (IV) se une al enlazador L, por ejemplo, en un ADC de Fórmula (I), como se muestra en la Fórmula (IV–A):



(IV–A).

[0425] En diversas otras formas de realización, el resto farmacológico es un compuesto modulador de empalme de Fórmula (VI):



(VI), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 y R^9 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido

alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, $–NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{10} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos –C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17};

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

en donde R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno; y

en donde R^1 y R^9 no pueden estar ambos ausentes.

[0426] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

[0427] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y

grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

[0428] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

[0429] En algunas formas de realización, R^5 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^5 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^5 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^5 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^5 es un grupo alquilo C1–C4.

[0430] En algunas formas de realización, R^9 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C4) y $–CD_3$. En algunas formas de realización, R^9 está ausente. En algunas formas de realización, R^9 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^9 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es metilo. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es etilo. En algunas formas de realización, R^9 es un grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, el grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4) es –(C=O)–metilo. En algunas formas de realización, R^9 es $–CD_3$.

[0431] En algunas formas de realización, R^{10} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C4) y $–CD_3$. En algunas formas de realización, R^{10} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{10} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es metilo. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es etilo. En algunas formas de realización, R^{10} es un grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, el grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4) es –(C=O)–metilo. En algunas formas de realización, R^{10} es $–CD_3$.

[0432] En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–OR^{17}$, en donde R^{17} se

selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –$NR^{15}R^{16}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –$NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –$NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}, y en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es –O–C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^6 es –$NR^{15}R^{16}$.

[0433] En algunas formas de realización, R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^7 es –O–C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^7 es –$NR^{15}R^{16}$.

[0434] En algunas formas de realización, R^8 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y (alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo hidroxilo. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1).

[0435] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–O–R^{17}.

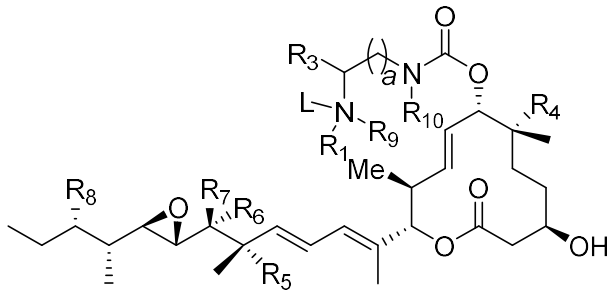
[0436] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0437] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En

algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

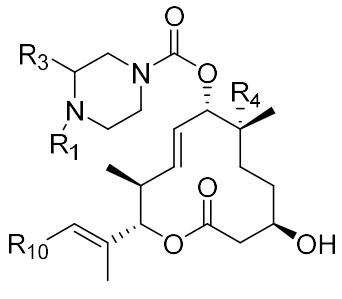
[0438] En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3 o 4. En algunas formas de realización, a es 1, 2 o 3. En algunas formas de realización, a es 1 o 2. En algunas formas de realización, a es 1. En algunas formas de realización, a es 2. En algunas formas de realización, a es 3. En algunas formas de realización, a es 4. En algunas formas de realización, a es 5. En algunas formas de realización, a es 6. En algunas formas de realización, a es 7. En algunas formas de realización, a es 8. En algunas formas de realización, a es 9. En algunas formas de realización, a es 10.

[0439] En algunas formas de realización, el compuesto modulador de empalme de Fórmula (VI) se une al enlazador L, por ejemplo, en un ADC de Fórmula (I), como se muestra en la Fórmula (VI–A):



(VI–A).

[0440] En diversas otras formas de realización, el resto farmacológico es un compuesto modulador de empalme de Fórmula (VIII):



(VIII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8,

grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6; y

R^{10} se selecciona de carbociclos de 3 a 10 miembros y heterociclos de 3 a 10 miembros, cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 3 R^a, en donde cada R^a se selecciona independientemente de halógenos, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, $–S(=O)_w–$(heterociclos de 4 a 7 miembros), carbociclos de 4 a 7 miembros y heterociclos de 4 a 7 miembros;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^3, R^4, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(grupos heterociclilo C3–C10) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, cada uno de los cuales está sustituido con 0, 1 o 2 grupos independientemente seleccionados de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$ y grupos alquilo C1–C3; y

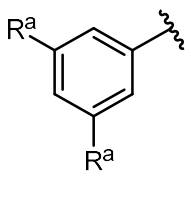
w es 0, 1 o 2.

[0441] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

[0442] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

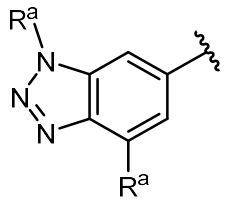
[0443] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

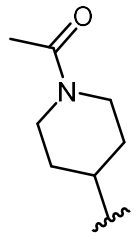
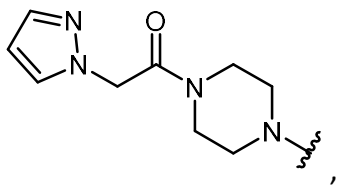
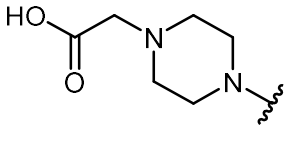
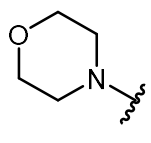
[0444] En algunas formas de realización, R^{10} se selecciona de carbociclos de 6 a 9 miembros y heterociclos de 6 a 9 miembros, cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6.

[0445] En algunas formas de realización, el carbociclo es un fenilo sustituido con 0 a 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, el fenilo está sustituido con 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 1 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, el fenilo es 

.

[0446] En algunas formas de realización, el heterociclo es un heterociclo de 9

miembros sustituido con 0 a 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, el heterociclo de 9 miembros es  .

[0447] En algunas formas de realización, R^a se selecciona de halógenos, carbociclos de 3 a 10 miembros y heterociclos de 3 a 10 miembros, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, R^a se selecciona de halógenos,  ,  ,  y  .

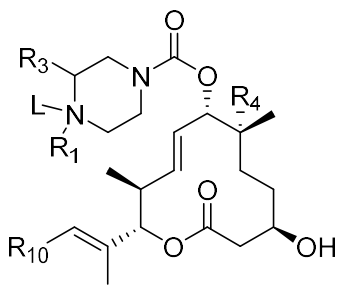
[0448] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0449] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0450] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo

C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

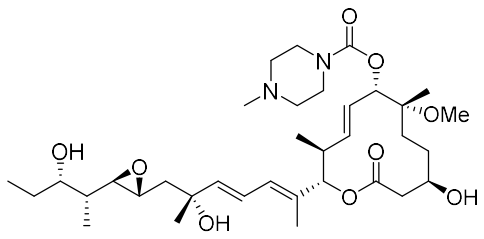
[0451] En algunas formas de realización, el compuesto modulador de empalme de Fórmula (VIII) se une al enlazador L, por ejemplo, en un ADC de Fórmula (I), como se muestra en la Fórmula (VIII–A):



(VIII–A).

[0452] En diversas formas de realización, el resto farmacológico es un modulador de empalme seleccionado de D2 y D1.

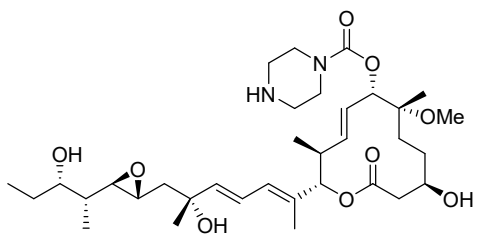
[0453] En diversas formas de realización, el resto farmacológico es D2. En diversas formas de realización, la estructura del resto farmacológico D2 usado en los ADC divulgados se muestra a continuación:



D2

[0454] En diversas formas de realización, el enlazador en los ADC (por ejemplo, los ADC de Fórmula (I)) descritos en la presente) se unen covalentemente con el resto farmacológico D2 a través de una amina en el grupo piperazina. En diversas formas de realización, el resto farmacológico es un derivado de D2. En diversas formas de realización, el derivado D2 conserva al menos una función o actividad biológica como D2 (por ejemplo, unión al complejo SF3b, actividad de empalme *in vitro*, citotoxicidad) pero tiene una estructura química alterada.

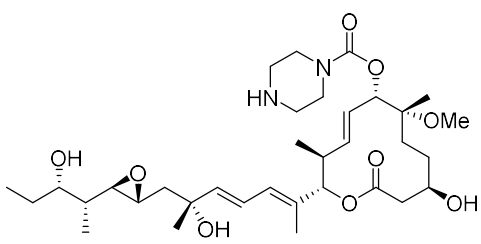
[0455] En diversas formas de realización, el resto farmacológico es D1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En diversas formas de realización, la estructura del resto farmacológico D1 usado en los ADC divulgados se muestra a continuación:



D1

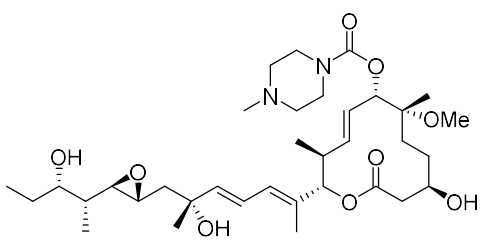
[0456] En diversas formas de realización, el enlazador en los ADC (por ejemplo, los ADC de Fórmula (I)) descritos en la presente se unen covalentemente al resto farmacológico D1 a través de una amina en el grupo piperazina. En diversas formas de realización, el resto farmacológico es un derivado de D1. En diversas formas de realización, el derivado D1 conserva al menos una función o actividad biológica como D1 (por ejemplo, unión al complejo SF3b, actividad de empalme *in vitro*, citotoxicidad) pero tiene una estructura química alterada.

[0457] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D1:



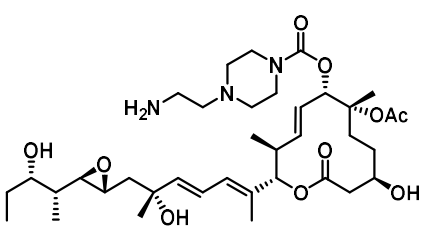
(D1).

[0458] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D2:



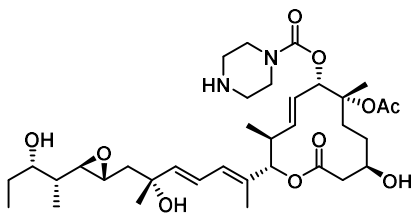
(D2).

[0459] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D3:

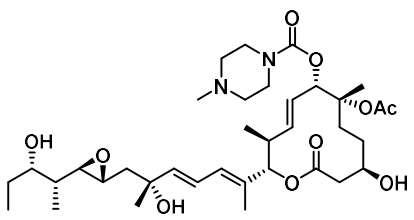


(D3).

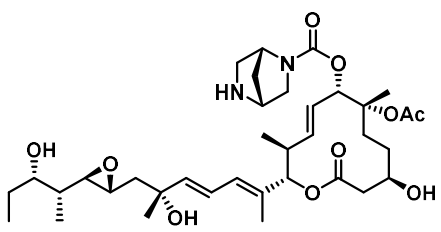
[0460] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D4:


(D4).

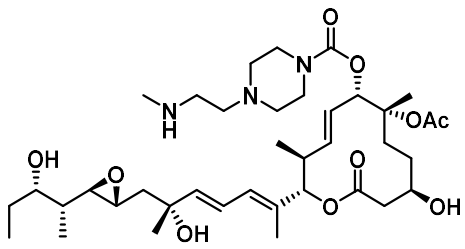
[0461] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D4':


(D4').

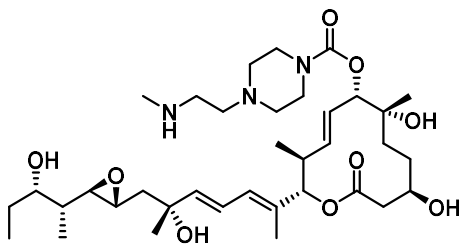
[0462] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D5:


(D5.)

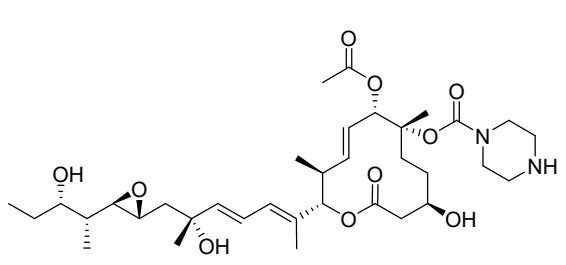
[0463] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D6:


(D6).

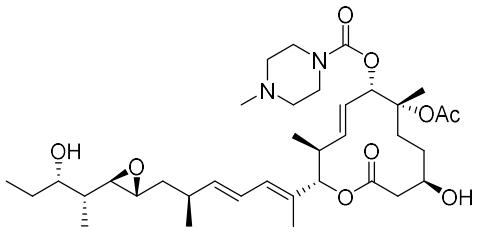
[0464] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D7:


(D7).

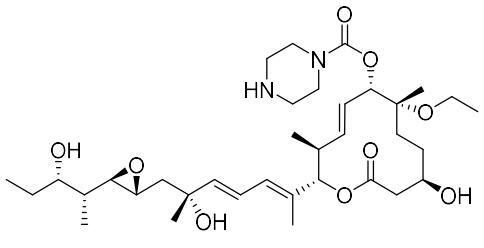
[0465] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D8:


(D8).

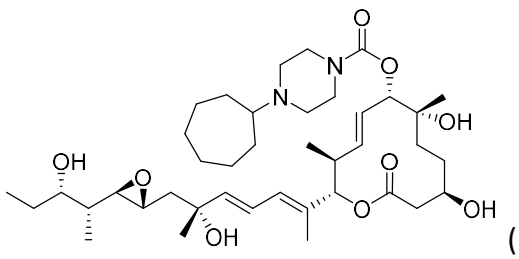
[0466] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D9:


(D9).

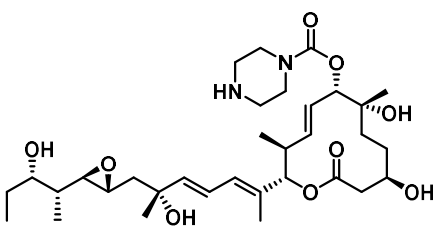
[0467] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D10:


(D10).

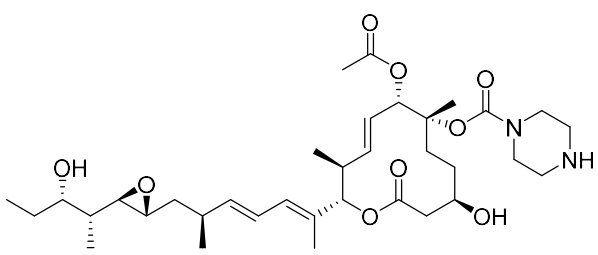
[0468] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D11:


(D11).

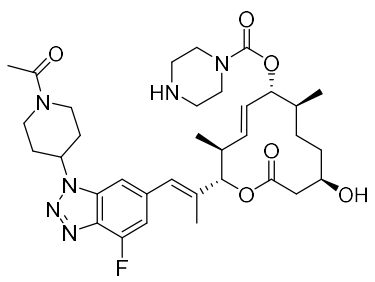
[0469] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D12:


(D12).

[0470] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D13:

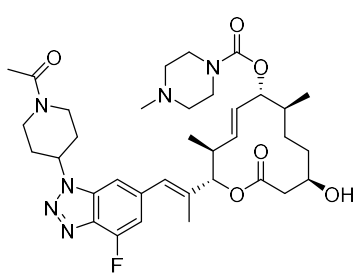

(D13).

[0471] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D14:



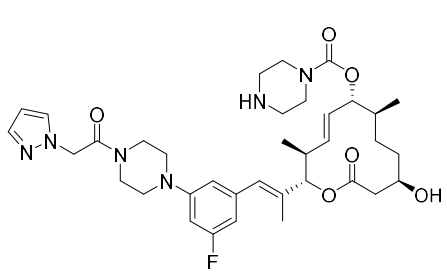
(D14).

[0472] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D15:



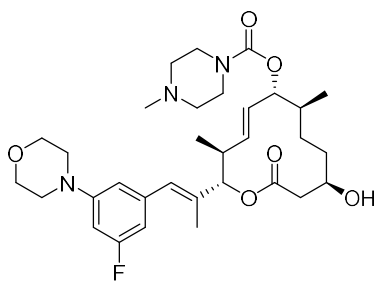
(D15).

[0473] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D16:



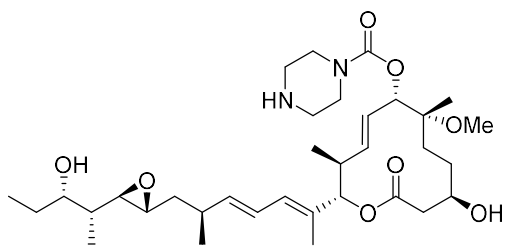
(D16).

[0474] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D17:



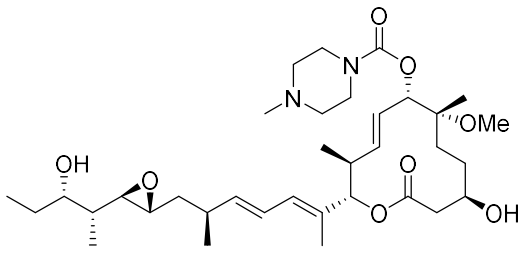
(D17).

[0475] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D18:

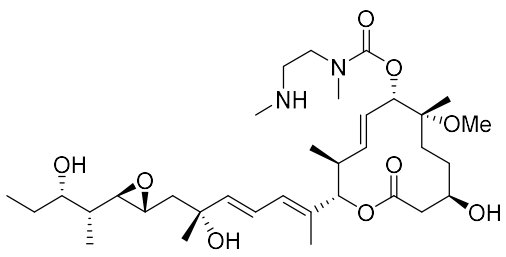


(D18).

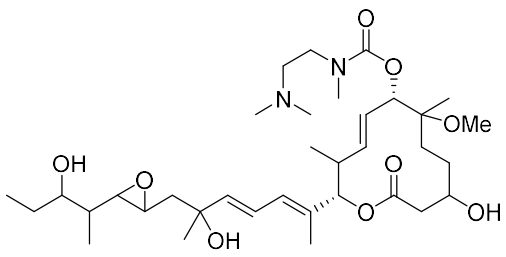
[0476] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D19:


(D19).

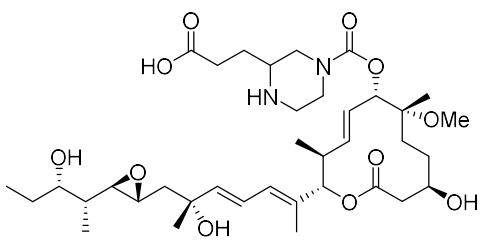
[0477] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D20:


(D20).

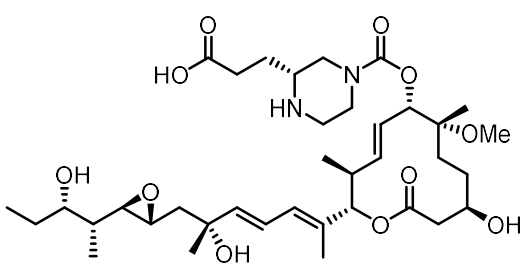
[0478] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D21:


(D21).

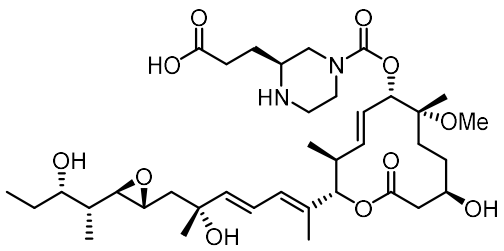
[0479] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D22:


(D22).

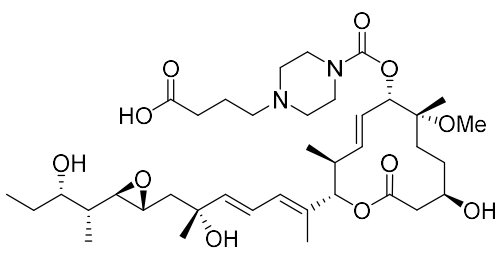
[0480] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D23:


(D23).

[0481] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D24:


(D24).

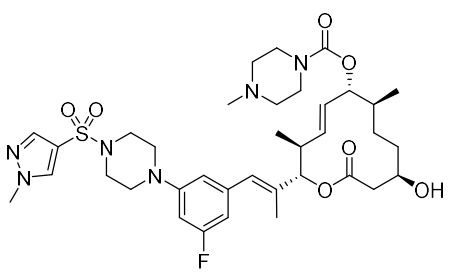
[0482] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D25:


(D25).

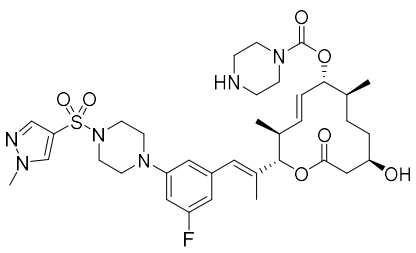
[0483] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D26:

(D26).

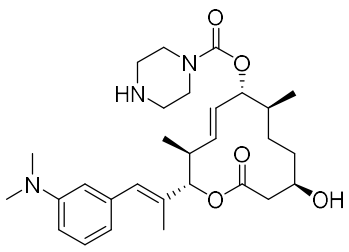
[0484] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D27:


(D27).

[0485] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D28:

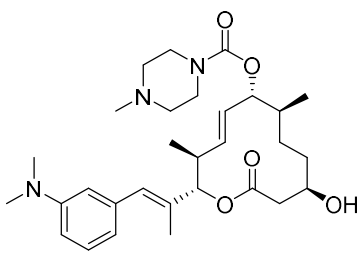

(D28).

[0486] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D29:



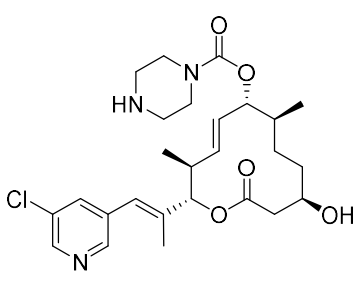
(D29).

[0487] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D30:



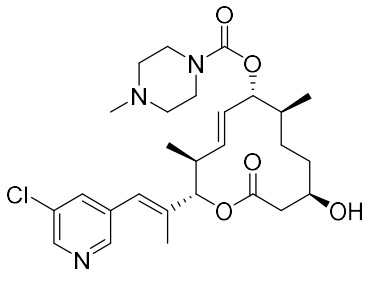
(D30).

[0488] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D31:



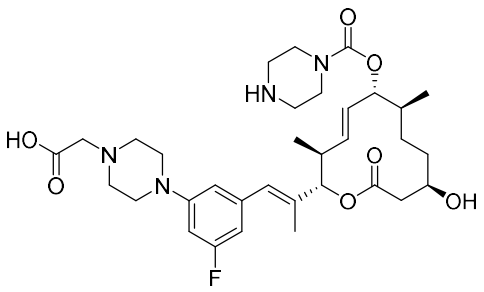
(D31).

[0489] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D32:



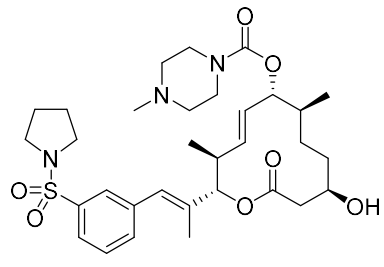
(D32).

[0490] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D33:



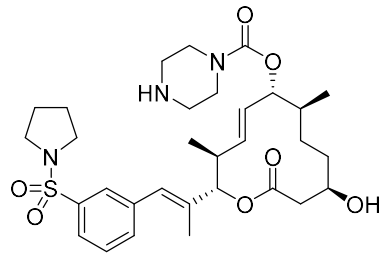
(D33).

[0491] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D34:



(D34).

[0492] En algunas formas de realización, el modulador de empalme comprende D35:



(D35).

[0493] Un ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que apunta a una célula neoplásica;

D es D2;

L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0494] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4 y/o STEAP1.

[0495] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que

comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0496] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CD138. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2 murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0497] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0498] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MSLN. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MSLN o fragmento de unión a antígeno.

[0499] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLH1 o fragmento de unión a antígeno.

[0500] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CDH6 o fragmento de unión a antígeno.

[0501] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CEACAM5 o fragmento de unión a antígeno.

[0502] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CFC1B o fragmento de unión a antígeno.

[0503] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–ENPP3 o fragmento de unión a antígeno.

[0504] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0505] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HAVCR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0506] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa KIT. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–KIT o fragmento de unión a antígeno.

[0507] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MET. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MET o fragmento de unión a antígeno.

[0508] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MUC16 o fragmento de unión a antígeno.

[0509] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC39A6 o fragmento de unión a antígeno.

[0510] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC44A4 o fragmento de unión a antígeno.

[0511] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa STEAP1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–STEAP1 o fragmento de unión a antígeno.

[0512] En algunas formas de realización, L se selecciona de cualquiera de los enlazadores divulgados en la presente, o cualquier combinación de componentes enlazadores divulgados en la presente. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC, Mal–$(PEG)_2$–CO, MC–Val–Ala–pAB, MC–Val–Ala–pABC, MC–Val–Cit–pAB, Mal–Hex, Mal–Et o Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, el enlazador también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23, o ADL15. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL12, ADL14 o ADL15. En algunas formas de realización, el enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 también

puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales.

[0513] Otro ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que apunta a una célula neoplásica;

D es D1;

L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0514] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4 y/o STEAP1.

[0515] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0516] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CD138. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID

NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2 murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0517] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0518] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MSLN. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MSLN o fragmento de unión a antígeno.

[0519] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno apunta a una célula que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLH1 o fragmento de unión a antígeno.

[0520] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CDH6 o fragmento de unión a antígeno.

[0521] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CEACAM5 o fragmento de unión a antígeno.

[0522] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CFC1B o fragmento de unión a antígeno.

[0523] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–ENPP3 o fragmento de unión a antígeno.

[0524] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0525] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HAVCR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0526] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa KIT. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–KIT o fragmento de unión a antígeno.

[0527] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MET. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MET o fragmento de unión a antígeno.

[0528] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno apunta a una célula que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MUC16 o fragmento de unión a antígeno.

[0529] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC39A6 o fragmento de unión a antígeno.

[0530] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC44A4 o fragmento de unión a antígeno.

[0531] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa STEAP1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–STEAP1 o fragmento de unión a antígeno.

[0532] Otro ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que apunta a una célula neoplásica;

D es D4;

L es un enlazador que une en forma covalente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0533] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4 y/o STEAP1.

[0534] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2)

y SEQ ID NO:6 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0535] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CD138. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0536] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que

comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0537] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MSLN. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MSLN o fragmento de unión a antígeno.

[0538] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLH1 o fragmento de unión a antígeno.

[0539] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CDH6 o fragmento de unión a antígeno.

[0540] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CEACAM5 o fragmento de unión a antígeno.

[0541] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CFC1B o fragmento de unión a antígeno.

[0542] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–ENPP3 o fragmento de unión a antígeno.

[0543] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLR1 o fragmento de

unión a antígeno.

[0544] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HAVCR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0545] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa KIT. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–KIT o fragmento de unión a antígeno.

[0546] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MET. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MET o fragmento de unión a antígeno.

[0547] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MUC16 o fragmento de unión a antígeno.

[0548] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC39A6 o fragmento de unión a antígeno.

[0549] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC44A4 o fragmento de unión a antígeno.

[0550] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa STEAP1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–STEAP1 o fragmento de unión a antígeno.

[0551] Otro ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que apunta a una célula neoplásica;

D es D12;

L es un enlazador que une en forma covalente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0552] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4 y/o STEAP1.

[0553] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0554] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CD138. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende

una región constante de cadena pesada de IgG2a murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0555] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0556] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MSLN. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MSLN o fragmento de unión a antígeno.

[0557] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLH1 o fragmento de unión a antígeno.

[0558] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CDH6 o fragmento de unión a antígeno.

[0559] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno apunta a una célula que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CEACAM5 o fragmento de unión a antígeno.

[0560] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CFC1B o fragmento de unión a antígeno.

[0561] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–ENPP3 o fragmento de unión a antígeno.

[0562] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0563] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HAVCR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0564] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa KIT. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–KIT o fragmento de unión a antígeno.

[0565] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MET. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MET o fragmento de unión a antígeno.

[0566] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MUC16 o fragmento de unión a antígeno.

[0567] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC39A6 o fragmento de unión a antígeno.

[0568] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno apunta a una célula que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC44A4 o fragmento de unión a antígeno.

[0569] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa STEAP1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–STEAP1 o fragmento de unión a antígeno.

[0570] Otro ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

Ab–(L–D)$_p$ (I)

en donde

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que apunta a una célula neoplásica;

D es D15;

L es un enlazador que une en forma covalente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0571] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4 y/o STEAP1.

[0572] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HER2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0573] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CD138. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa murina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG2a humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0574] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa EPHA2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región

constante de cadena liviana de Ig kappa humana.

[0575] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MSLN. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MSLN o fragmento de unión a antígeno.

[0576] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLH1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLH1 o fragmento de unión a antígeno.

[0577] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CDH6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CDH6 o fragmento de unión a antígeno.

[0578] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CEACAM5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CEACAM5 o fragmento de unión a antígeno.

[0579] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa CFC1B. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–CFC1B o fragmento de unión a antígeno.

[0580] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa ENPP3. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–ENPP3 o fragmento de unión a antígeno.

[0581] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa FOLR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–FOLR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0582] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa HAVCR1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–HAVCR1 o fragmento de unión a antígeno.

[0583] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa KIT. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–KIT o fragmento de

unión a antígeno.

[0584] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MET. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MET o fragmento de unión a antígeno.

[0585] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa MUC16. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–MUC16 o fragmento de unión a antígeno.

[0586] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC39A6. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC39A6 o fragmento de unión a antígeno.

[0587] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa SLC44A4. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–SLC44A4 o fragmento de unión a antígeno.

[0588] En algunas otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno apunta a una célula que expresa STEAP1. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti–STEAP1 o fragmento de unión a antígeno.

[0589] En algunas formas de realización, L se selecciona de cualquiera de los enlazadores divulgados en la presente, o cualquier combinación de componentes enlazadores divulgados en la presente. En algunas formas de realización, L es un enlazador escindible. En algunas formas de realización, L es un enlazador no escindible. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC, MC–Val–Ala–pABC, MC–Val–Ala–pAB, MC–Glu–Val–Cit–pABC, Ala–Ala–Asn–pABC o β–glucuronida. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende Mal–Hex, Mal–Et, o Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC, Mal–$(PEG)_2$–CO, MC–Val–Ala–pAB, MC–Val–Ala–pABC, MC–Val–Cit–pAB, Mal–Hex, Mal–Et o Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, el enlazador también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL12, ADL14 o ADL15. En algunas formas de realización, el enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 también puede comprender una o más

unidades espaciadoras adicionales.

[0590] En algunas formas de realización, *p* es de 1 a 10. En algunas formas de realización, *p* es de 2 a 8. En algunas formas de realización, *p* es de 4 a 8. En algunas formas de realización, *p* es 4. En algunas formas de realización, *p* es 8.

[0591] Otro ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

Ab–(L–D)$_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo anti–HER2 o fragmento de unión a antígeno que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3);

D es D2, D1, D4, D12 o D15;

L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0592] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20.

[0593] En algunas formas de realización, L se selecciona de cualquiera de los enlazadores divulgados en la presente, o cualquier combinación de componentes enlazadores divulgados en la presente. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC, Mal–(PEG)$_2$–CO, MC–Val–Ala–pAB, MC–Val–Ala–pABC, MC–Val–Cit–pAB, Mal–Hex, Mal–Et o Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, el enlazador también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL12, ADL14 o ADL15. En algunas formas de realización, el enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales.

[0594] Otro ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

Ab–(L–D)$_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo anti–CD138 o fragmento de unión a antígeno que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:7

(HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2) y SEQ ID NO:9 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:10 (LCDR1), SEQ ID NO:11 (LCDR2) y SEQ ID NO:12 (LCDR3);

D es D2, D1, D4, D12 o D15;

L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0595] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22.

[0596] En algunas formas de realización, L se selecciona de cualquiera de los enlazadores divulgados en la presente, o cualquier combinación de componentes enlazadores divulgados en la presente. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC, Mal–$(PEG)_2$–CO, MC–Val–Ala–pAB, MC–Val–Ala–pABC, MC–Val–Cit–pAB, Mal–Hex, Mal–Et o Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, el enlazador también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL12, ADL14 o ADL15. En algunas formas de realización, el enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales.

[0597] Otro ADC ejemplar tiene la Fórmula (I):

$Ab–(L–D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo anti–EPHA2 o fragmento de unión a antígeno que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2) y SEQ ID NO:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2) y SEQ ID NO:18 (LCDR3);

D es D2, D1, D4, D12 o D15;

L es un enlazador que une covalentemente Ab a D; y

p es un número entero de 1 a 15.

[0598] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24.

[0599] En algunas formas de realización, L se selecciona de cualquiera de los enlazadores divulgados en la presente, o cualquier combinación de componentes enlazadores divulgados en la presente. En algunas formas de realización, L es un enlazador que comprende MC–Val–Cit–pABC, Mal–$(PEG)_2$–CO, MC–Val–Ala–pAB, MC–Val–Ala–pABC, MC–Val–Cit–pAB, Mal–Hex, Mal–Et o Mal–Et–O–Et. En algunas formas de realización, el enlazador también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15. En algunas formas de realización, L es un enlazador ADL12, ADL14 o ADL15. En algunas formas de realización, el enlazador ADL1, ADL2, ADL5, ADL6, ADL7, ADL12, ADL13, ADL14, ADL21, ADL23 o ADL15 también puede comprender una o más unidades espaciadoras adicionales.

[0600] En diversas formas de realización, los ADC que comprenden un resto farmacológico D2 o D1 pueden incluir un enlazador escindible o no escindible.

[0601] En diversas formas de realización, el enlazador es un enlazador escindible. En diversas formas de realización, el enlazador escindible comprende MC–Val–Cit–pABC. En diversas formas de realización, el enlazador escindible comprende MC–Val–Ala–pABC. En diversas formas de realización, el enlazador escindible comprende MC–Val–Ala–pAB. En diversas formas de realización, el enlazador escindible comprende MC–Glu–Val–Cit–pABC. En diversas formas de realización, el enlazador escindible comprende MC–Ala–Ala–Asn–pABC.

[0602] En diversas otras formas de realización, el enlazador es un enlazador no escindible. En diversas formas de realización, el enlazador no escindible comprende MC, solo o en combinación con al menos una unidad espaciadora adicional. En diversas formas de realización, el enlazador no escindible comprende Mal–Hex, solo o en combinación con al menos una unidad espaciadora adicional. En diversas formas de realización, el enlazador no escindible comprende Mal–Et, solo o en combinación con al menos una unidad espaciadora adicional. En diversas formas de realización, el enlazador no escindible comprende Mal–Et–O–Et, solo o en combinación con al menos una unidad espaciadora adicional.

[0603] En diversas formas de realización, en los ADC que comprenden un resto farmacológico D2 o D1, *p* es de 1 a 10. En diversas formas de realización, *p* es de 2 a 8. En diversas formas de realización, *p* es de 4 a 8. En diversas formas de realización, *p* es 4. En diversas formas de realización, *p* es 8.

[0604] En diversas formas de realización, un ADC que comprende un resto

farmacológico D2 o D1 como se divulga en la presente demuestra mejor relación fármaco:anticuerpo, menores niveles de agregación, mayor estabilidad, mayor destrucción en blanco de células cancerígenas, menor destrucción fuera de blanco de células no cancerígenas, y/o mayor citotoxicidad y/o potencia respecto de un ADC que comprende un resto farmacológico alternativo (por ejemplo, un resto farmacológico de modulador de empalme alternativo). En algunas formas de realización, un ADC que comprende un resto farmacológico D2 o D1 como se divulga en la presente proporciona propiedades buenas o superiores en una o más de las categorías enumeradas antes, o en un espectro de propiedades funcionales para un ADC terapéutico. En algunas formas de realización, un ADC que comprende un resto farmacológico D2 o D1 exhibe una potencia sorprendentemente efectiva y mayor inhibición del crecimiento y/o la proliferación celular en células que expresan el antígeno apuntado por el ADC, en comparación con un ADC que comprende un resto farmacológico alternativo (por ejemplo, un resto farmacológico de modulador de empalme alternativo). En algunas formas de realización, la potencia se puede medir en términos de la concentración del compuesto para causar una reducción del 50% en la proliferación celular (GI_{50}). En diversas formas de realización, los ADC que comprenden un resto farmacológico D2 o D1 exhiben una estabilidad *in vivo* sorprendentemente mayor (por ejemplo, estabilidad en plasma), en comparación con un ADC con un resto farmacológico alternativo (por ejemplo, un resto farmacológico de modulador de empalme alternativo, por ejemplo, tailanstatina A). Véase, por ejemplo, el ADC descrito en Puthenveetil *et al.* (Bioconjugate Chem. (2016) 27:1880–8), que muestra una bioconversión completa de la carga útil a las 72 horas (es decir, el acetato es completamente hidrolizado).

[0605] En ciertas formas de realización, un intermediario, que es el precursor del resto enlazador, se hace reaccionar con el resto farmacológico (por ejemplo, el modulador de empalme) en condiciones apropiadas. En ciertas formas de realización, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el intermediario o enlazador. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermediario, o el fármaco derivatizado (fármaco más enlazador), posteriormente se hace reaccionar con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en condiciones apropiadas. Alternativamente, el intermediario o enlazador primero puede hacerse reaccionar con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivatizado, y luego hacerse reaccionar con el fármaco o fármaco derivatizado.

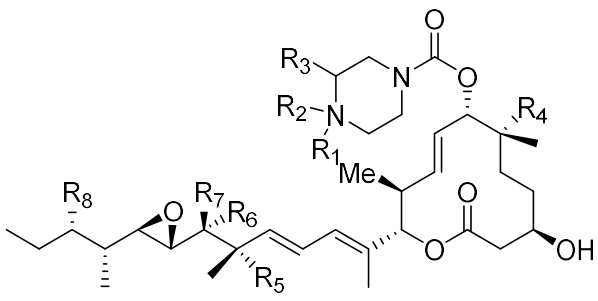
[0606] Se dispone de varias reacciones diferentes para la unión covalente del resto farmacológico y/o resto enlazador con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Esto a menudo se logra por reacción de uno o más residuos de aminoácidos del

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, incluyendo los grupos amina de lisina, los grupos ácido carboxílico libre de ácido glutámico y ácido aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína, y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, la unión covalente no específica se puede lograr usando una reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) en un resto farmacológico con un grupo amino (o carboxi) en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Además, también se pueden usar grupos bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino en un resto farmacológico con un grupo amino en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Para la unión de fármacos (por ejemplo, un modulador de empalme) con agentes de unión también se dispone de la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación de periodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxi, con lo cual se forma un aldehído que luego se hace reaccionar con el agente de unión. La unión se produce a través de la formación de una base de Schiff con grupos amino del agente de unión. También se pueden usar isotiocianatos como agentes de acoplamiento para la unión covalente de fármacos con agentes de unión. Otras técnicas son conocidas por el experto en el arte y están dentro del alcance de la presente divulgación. Los ejemplos de restos farmacológicos que pueden generarse y unirse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno usando diversas químicas conocidas en el arte incluyen moduladores de empalme, por ejemplo, los moduladores de empalme descritos y ejemplificados en la presente.

Enlazador–fármaco / Compuestos farmacológicos

[0607] También se divulgan en la presente compuestos ejemplares de enlazador–fármaco (L–D), así como composiciones que comprenden múltiples copias de dichos compuestos. En diversas formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco divulgados en la presente pueden definirse por la fórmula genérica: L–D, en donde L= un resto enlazador y D = un resto farmacológico (por ejemplo, un resto farmacológico de modulador de empalme). En ciertas formas de realización, los compuestos L–D divulgados son adecuados para usar en los ADC descritos en la presente, por ejemplo, en ADC de Fórmula (I).

[0608] En diversas formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (III). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (III):



(III), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 está ausente o es un enlazador;

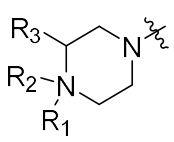
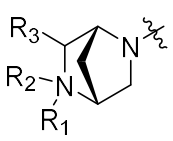
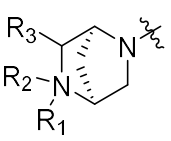
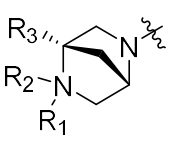
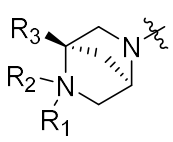
R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, $–NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17};

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

Z'' se selecciona de  ,  ,  ,  y  ;

en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno; y

en donde si R^2 es un enlazador, entonces ni R^6 ni R^7 es un enlazador, y si R^6 o R^7 es un enlazador, entonces R^2 está ausente.

[0609] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 está ausente. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

[0610] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

[0611] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

[0612] En algunas formas de realización, R^5 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^5 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^5 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^5 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^5 es un grupo alquilo C1–C4.

[0613] En algunas formas de realización, R^2 está ausente y R^6 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^2 está ausente y R^7 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^2 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^7 es hidrógeno.

[0614] En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–O–R^{17}$. En

algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–OR^{17}$, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–O–R^{17}$, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$ y R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$ y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$ y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, $–C(=O)–R^{17}$, y $–C(=O)–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, $–C(=O)–R^{17}$ y $–C(=O)–O–R^{17}$, y en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^6 es $–NR^{15}R^{16}$.

[0615] En algunas formas de realización, R^7 es $–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^7 es $–O–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^7 es $–NR^{15}R^{16}$.

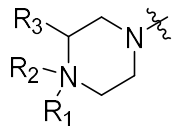
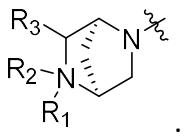
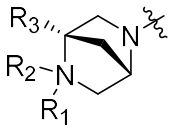
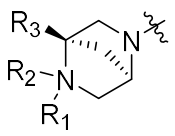
[0616] En algunas formas de realización, R^8 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y (alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo hidroxilo. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1).

[0617] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es $–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^{15} es $–C(=O)–O–R^{17}$.

[0618] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es $–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^{16} es $–C(=O)–O–R^{17}$.

[0619] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En

algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

[0620] En algunas formas de realización, Z' es  . En algunas formas de realización, Z' es  . En algunas formas de realización, Z' es  . En algunas formas de realización, Z' es  . En algunas formas de realización, Z' es  .

[0621] En algunas formas de realización, R^2 es un enlazador. En algunas formas de realización, el enlazador comprende al menos un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el al menos un resto peptídico escindible es escindible por una enzima. En algunas formas de realización, el enlazador o resto peptídico escindible comprende al menos una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido se selecciona de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano y citrulina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende alanina y valina.

[0622] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto elegido de una sulfonamida, una β–glucuronida, un disulfuro y un carbonilo. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una sulfonamida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una β–glucuronida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un disulfuro. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un carbonilo.

[0623] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora se selecciona de grupos alquilo y restos polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C12. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es metileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es etileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–propileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–butileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–pentileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–hexileno. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$, en donde m es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, m es 1. En algunas formas de realización, m es 2. En algunas formas de realización, m es 3. En algunas formas de realización, m es 4. En algunas formas de realización, m es 5. En algunas formas de realización, m es 6.

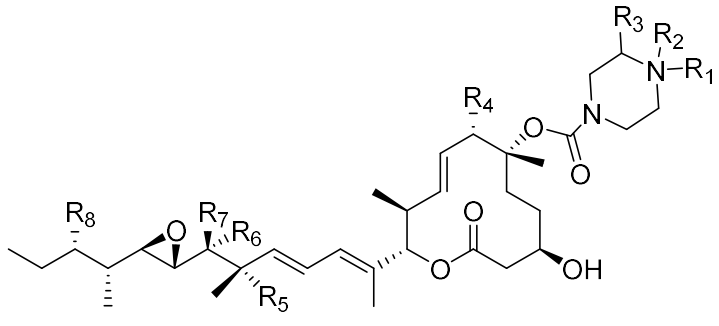
[0624] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto maleimida (Mal) (“Mal–unidad espaciadora”). En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora auto–inmolante. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante se selecciona de p–aminobenciloxicarbonilo (pABC) y p–aminobencilo (pAB).

[0625] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, un grupo alquilo, al menos una unidad de aminoácido y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C1–C6.

[0626] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, resto PEG, al menos una unidad de aminoácido, y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de

realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende –$(PEG)_m$–, en donde m es un número entero de 1 a 6.

[0627] En diversas otras formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (V). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (V):



(V), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 está ausente o es un enlazador;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6); y

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, $–NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno; y

en donde si R^2 es un enlazador, entonces ni R^6 ni R^7 es un enlazador, y si R^6 o R^7 es un enlazador, entonces R^2 está ausente.

[0628] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 está ausente. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

[0629] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

[0630] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

[0631] En algunas formas de realización, R^5 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^5 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^5 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^5 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^5 es un grupo alquilo C1–C4.

[0632] En algunas formas de realización, R^2 está ausente y R^6 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^2 está ausente y R^7 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^2 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^7 es hidrógeno.

[0633] En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –OR^{17}, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –O–R^{17}, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17} y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –N$R^{15}R^{16}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –N$R^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es –N$R^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}, y en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^6 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es –O–C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^6 es –N$R^{15}R^{16}$.

[0634] En algunas formas de realización, R^7 es –O–R^{17}. En algunas formas de realización, R^7 es –O–C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^7 es –N$R^{15}R^{16}$.

[0635] En algunas formas de realización, R^8 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y (alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo hidroxilo. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1).

[0636] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0637] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0638] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un

grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

[0639] En algunas formas de realización, R^2 es un enlazador. En algunas formas de realización, el enlazador comprende al menos un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el al menos un resto peptídico escindible es escindible por una enzima. En algunas formas de realización, el enlazador o resto peptídico escindible comprende al menos una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido se selecciona de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano y citrulina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende alanina y valina.

[0640] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto elegido de una sulfonamida, una β–glucuronida, un disulfuro y un carbonilo. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una sulfonamida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una β–glucuronida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un disulfuro. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un carbonilo.

[0641] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora se selecciona de grupos alquilo y restos polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C12. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es metileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es etileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–propileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–butileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–pentileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–hexileno. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$, en donde m es un número entero de 1 a

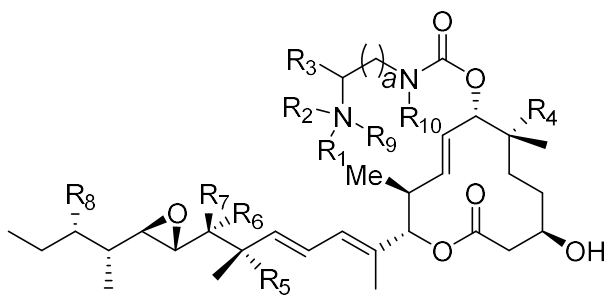
10. En algunas formas de realización, m es 1. En algunas formas de realización, m es 2. En algunas formas de realización, m es 3. En algunas formas de realización, m es 4. En algunas formas de realización, m es 5. En algunas formas de realización, m es 6.

[0642] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto maleimida (Mal) ("Mal–unidad espaciadora"). En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora auto–inmolante. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante se selecciona de p–aminobenciloxicarbonilo (pABC) y p–aminobencilo (pAB).

[0643] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, un grupo alquilo, al menos una unidad de aminoácido y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C1–C6.

[0644] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, resto PEG, al menos una unidad de aminoácido y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$, en donde m es un número entero de 1 a 6.

[0645] En diversas otras formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (VII). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (VII):



(VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 y R^9 se seleccionan cada uno independientemente de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 está ausente o es un enlazador;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4, R^5 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, $–O–R^{17}$, –O–C(=O)–R^{17}, –O–C(=O)–$NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, $–NR^{15}R^{16}$ y un enlazador;

R^{10} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos –C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17};

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde al menos uno de R^6 y R^7 es hidrógeno;

en donde si R^2 es un enlazador, entonces ni R^6 ni R^7 es un enlazador, y si R^6 o R^7 es un enlazador, entonces R^2 está ausente; y

en donde R^1 y R^9 no pueden estar ambos ausentes.

[0646] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 está ausente. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

[0647] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

[0648] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

[0649] En algunas formas de realización, R^5 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^5 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^5 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^5 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^5 es un grupo alquilo C1–C4.

[0650] En algunas formas de realización, R^9 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C4) y $–CD_3$. En algunas formas de realización, R^9 está ausente. En algunas formas de realización, R^9 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^9 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es metilo. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es etilo. En algunas formas de realización, R^9 es un grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4). En algunas

formas de realización, el grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4) es –(C=O)–metilo. En algunas formas de realización, R^9 es $–CD_3$.

[0651] En algunas formas de realización, R^{10} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C4) y $–CD_3$. En algunas formas de realización, R^{10} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{10} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es metilo. En algunas formas de realización, el grupo alquilo C1–C4 es etilo. En algunas formas de realización, R^{10} es un grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, el grupo –(C=O)–(alquilo C1–C4) es –(C=O)–metilo. En algunas formas de realización, R^{10} es $–CD_3$.

[0652] En algunas formas de realización, R^2 está ausente y R^6 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^2 está ausente y R^7 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^2 es un enlazador. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–OR^{17}$, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–O–R^{17}$, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$ y R^7 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$ y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno y grupos alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$ y R^7 es hidrógeno, en donde R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, $–C(=O)–R^{17}$, y $–C(=O)–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es hidrógeno y R^7 es $–NR^{15}R^{16}$, en donde R^{15} es H y R^{16} se selecciona de hidrógeno, R^{17}, $–C(=O)–R^{17}$ y $–C(=O)–O–R^{17}$, y en donde R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es $–O–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^6 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^6 es $–NR^{15}R^{16}$.

[0653] En algunas formas de realización, R^7 es $–O–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^7 es $–O–C(=O)–R^{17}$. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^7 es alquilo C1. En algunas formas de realización, R^7 es $–NR^{15}R^{16}$.

[0654] En algunas formas de realización, R^8 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4) y (alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^8 es un grupo hidroxilo. En algunas

formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^8 es un grupo –O–(alquilo C1).

[0655] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0656] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0657] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

[0658] En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas formas de realización, a es 1, 2, 3 o 4. En algunas formas de realización, a es 1, 2 o 3. En algunas formas de realización, a es 1 o 2. En algunas formas de realización, a es 1. En algunas formas de realización, a es 2. En algunas formas de realización, a es 3. En algunas formas de realización, a es 4. En algunas formas de realización, a es 5. En algunas formas de realización, a es 6. En algunas formas de realización, a es 7. En algunas formas de realización, a es 8. En algunas formas de realización, a es 9. En algunas formas de realización, a es 10.

[0659] En algunas formas de realización, R^2 es un enlazador. En algunas formas de realización, el enlazador comprende al menos un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el al menos un resto peptídico escindible es escindible por una enzima. En algunas formas de realización, el enlazador o resto peptídico escindible comprende al menos una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido se selecciona de arginina, histidina, lisina, ácido

aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano y citrulina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende alanina y valina.

[0660] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto elegido de una sulfonamida, una β–glucuronida, un disulfuro y un carbonilo. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una sulfonamida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una β–glucuronida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un disulfuro. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un carbonilo.

[0661] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora se selecciona de grupos alquilo y restos polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C12. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es metileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es etileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–propileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–butileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–pentileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–hexileno. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$, en donde m es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, m es 1. En algunas formas de realización, m es 2. En algunas formas de realización, m es 3. En algunas formas de realización, m es 4. En algunas formas de realización, m es 5. En algunas formas de realización, m es 6.

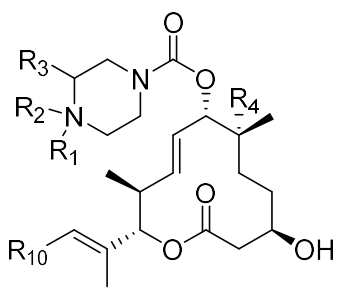
[0662] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto maleimida (Mal) (“Mal–unidad espaciadora”). En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora auto–inmolante. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante se selecciona de p–aminobenciloxicarbonilo (pABC) y p–aminobencilo (pAB).

[0663] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, un grupo alquilo, al menos una unidad de aminoácido y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de

realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C1–C6.

[0664] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, resto PEG, al menos una unidad de aminoácido y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$, en donde m es un número entero de 1 a 6.

[0665] En diversas otras formas de realización, los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados en la presente comprenden una estructura de enlazador–fármaco de acuerdo con la Fórmula (IX). En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto enlazador–fármaco (L–D) de Fórmula (IX):



(IX), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8, grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y $–CD_3$;

R^2 es un enlazador;

R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilamino C1–C6, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo, grupos heterociclilo C3–C8 y grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6);

R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C6) y grupos alquilo C1–C6;

R^{10} se selecciona de carbociclos de 3 a 10 miembros y heterociclos de 3 a 10

miembros, cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 3 R^a, en donde cada R^a se selecciona independientemente de halógenos, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos alquilhidroxi C1–C6, $–S(=O)_w–$(heterociclos de 4 a 7 miembros), carbociclos de 4 a 7 miembros y heterociclos de 4 a 7 miembros;

R^{15} y R^{16} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, R^{17}, –C(=O)–R^{17} y –C(=O)–O–R^{17}; y

R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C6, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8;

en donde R^1, R^2, R^3, R^4, R^{10}, R^{15}, R^{16} y R^{17} están sustituidos cada uno independientemente con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –O–(alquilo C1–C6), $–NR^{15}R^{16}$, grupos cicloalquilo C3–C8, grupos alquilhidroxi C1–C6, grupos alquilalcoxi C1–C6, grupos bencilo y grupos heterociclilo C3–C8; y

en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(grupos heterociclilo C3–C10) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6, cada uno de los cuales está sustituido con 0, 1 o 2 grupos independientemente seleccionados de halógenos, grupos hidroxilo, $–NR^{15}R^{16}$ y grupos alquilo C1–C3; y

w es 0, 1, o 2.

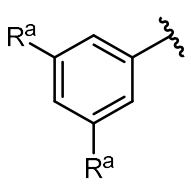
[0666] En algunas formas de realización, R^1 se selecciona de ausente, hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 está ausente. En algunas formas de realización, R^1 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es metilo. En algunas formas de realización, R^1 es etilo. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^1 es $–CH_2CH_2CH_2CO_2H$. En algunas formas de realización, R^1 es un grupo cicloalquilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^1 es cicloheptilo.

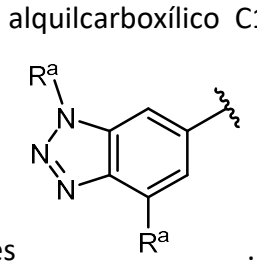
[0667] En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos alquilalcoxi C1–C4, grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4 y grupos alquilhidroxi C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 se selecciona de hidrógeno y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^3 es un grupo ácido alquilcarboxílico C1–C4. En algunas formas de realización, R^3 es $–CH_2CH_2CO_2H$.

[0668] En algunas formas de realización, R^4 se selecciona de hidrógeno, grupos hidroxilo, grupos –O–(alquilo C1–C4), grupos –O–C(=O)–(alquilo C1–C4) y grupos alquilo

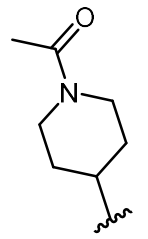
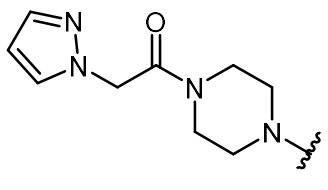
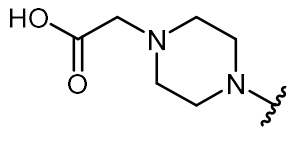
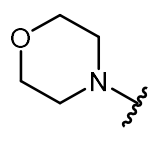
C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^4 es hidroxilo. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–OCH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo –O–C(=O)–(alquilo C1–C4). En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es $–O–C(=O)–CH_2CH_3$. En algunas formas de realización, R^4 es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^4 es metilo. En algunas formas de realización, R^4 es etilo.

[0669] En algunas formas de realización, R^{10} se selecciona de carbociclos de 6 a 9 miembros y heterociclos de 6 a 9 miembros, cada uno de los cuales está sustituido con 0 a 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6.

[0670] En algunas formas de realización, el carbociclo es un fenilo sustituido con 0 a 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, el fenilo está sustituido con 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, el fenilo es 
.

[0671] En algunas formas de realización, el heterociclo es un heterociclo de 9 miembros sustituido con 0 a 2 R^a, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, el heterociclo de 9 miembros es 
.

[0672] En algunas formas de realización, R^a se selecciona de halógenos, carbociclos

de 3 a 10 miembros y heterociclos de 3 a 10 miembros, en donde cada R^a está independientemente sustituido con 0 a 3 grupos seleccionados independientemente de halógenos, grupos hidroxilo, grupos alquilo C1–C6, grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6), grupos –(C=O)–(alquilo C1–C6)–(heterociclo de 3 a 10 miembros) y grupos ácido alquilcarboxílico C1–C6. En algunas formas de realización, R^a se selecciona de halógenos,  ,  ,  y  .

[0673] En algunas formas de realización, R^{15} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{15} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{15} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0674] En algunas formas de realización, R^{16} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{16} es R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–R^{17}. En algunas formas de realización, R^{16} es –C(=O)–O–R^{17}.

[0675] En algunas formas de realización, R^{17} se selecciona de hidrógeno, grupos alquilo C1–C4, grupos cicloalquilo C3–C6 y grupos heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es hidrógeno. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1–C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo alquilo C1. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3–C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo cicloalquilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3–C8. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C3. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C4. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C5. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C6. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C7. En algunas formas de realización, R^{17} es un grupo heterociclilo C8.

[0676] En algunas formas de realización, R^2 es un enlazador. En algunas formas de realización, el enlazador comprende al menos un resto peptídico escindible. En algunas formas de realización, el al menos un resto peptídico escindible es escindible por una enzima. En algunas formas de realización, el enlazador o resto peptídico escindible comprende al menos una unidad de aminoácido. En algunas formas de realización, la al

menos una unidad de aminoácido se selecciona de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano y citrulina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende alanina y valina.

[0677] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto elegido de una sulfonamida, una β–glucuronida, un disulfuro y un carbonilo. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una sulfonamida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende una β–glucuronida. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un disulfuro. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un carbonilo.

[0678] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora se selecciona de grupos alquilo y restos polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C12. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1–C6. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es metileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es etileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–propileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–butileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–pentileno. En algunas formas de realización, el grupo alquilo es n–hexileno. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$, en donde m es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, m es 1. En algunas formas de realización, m es 2. En algunas formas de realización, m es 3. En algunas formas de realización, m es 4. En algunas formas de realización, m es 5. En algunas formas de realización, m es 6.

[0679] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto maleimida (Mal) (“Mal–unidad espaciadora”). En algunas formas de realización, el enlazador comprende una unidad espaciadora auto–inmolante. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora auto–inmolante se selecciona de p–aminobenciloxicarbonilo (pABC) y p–aminobencilo (pAB).

[0680] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, un grupo alquilo, al menos una unidad de aminoácido y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al

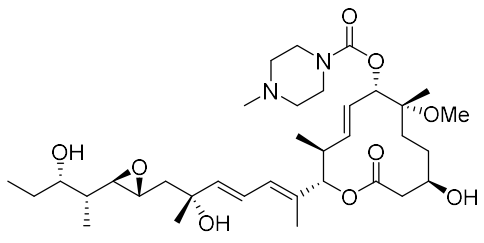
menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C1–C6.

[0681] En algunas formas de realización, el enlazador comprende una Mal–unidad espaciadora, resto PEG, al menos una unidad de aminoácido y un espaciador auto–inmolante. En algunas formas de realización, al menos una unidad de aminoácido se selecciona de alanina, citrulina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende alanina y valina. En algunas formas de realización, la al menos una unidad de aminoácido comprende citrulina y valina. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante se selecciona de pAB y pABC. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pAB. En algunas formas de realización, el espaciador auto–inmolante comprende pABC. En algunas formas de realización, el resto PEG comprende $–(PEG)_m–$, en donde m es un número entero de 1 a 6.

[0682] En algunas formas de realización, el resto farmacológico es un modulador de empalme elegido de D1, D2, D3, D4,D4', D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19, D20, D21, D22, D23, D24, D25, D26, D27, D28, D29, D30, D31, D32, D33, D34 y D35.

[0683] En diversas formas de realización, el resto farmacológico es un modulador de empalme seleccionado de D2 y D1.

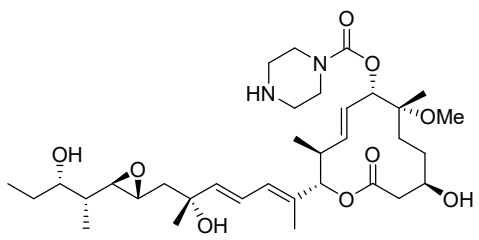
[0684] En diversas formas de realización, el resto farmacológico es D2. En diversas formas de realización, la estructura del resto farmacológico D2 usado en los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados se muestra a continuación:



D2

[0685] En diversas formas de realización, el enlazador en los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) descritos en la presente se unen covalentemente al resto farmacológico D2 a través de una amina en el grupo piperazina. En diversas formas de realización, el resto farmacológico es un derivado de D2. En diversas formas de realización, el derivado de D2 conserva al menos una función o actividad biológica como D2 (por ejemplo, unión al complejo SF3b, actividad de empalme *in vitro*, citotoxicidad) pero tiene una estructura química alterada.

[0686] En diversas formas de realización, el resto farmacológico es D1. En diversas formas de realización, la estructura del resto farmacológico D1 usado en los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) divulgados se muestra a continuación:

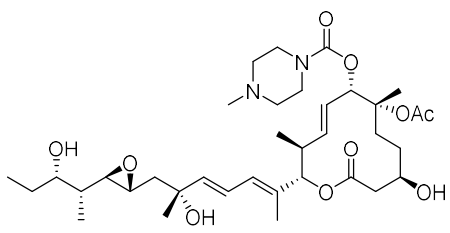


D1

[0687] En diversas formas de realización, el enlazador en los compuestos de enlazador–fármaco (L–D) descritos en la presente se une covalentemente al resto farmacológico D1 a través de una amina en el grupo piperazina. En diversas formas de realización, el resto farmacológico es un derivado de D1. En diversas formas de realización, el derivado de D1 conserva al menos una función o actividad biológica como D1 (por ejemplo, unión al complejo SF3b, actividad de empalme *in vitro*, citotoxicidad) pero tiene una estructura química alterada.

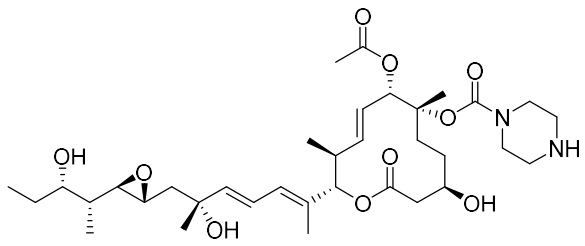
[0688] También se divulgan en la presente compuestos farmacológicos ejemplares de modulador de empalme, para usar como tales o como restos farmacológicos en los ADC divulgados en la presente. La presente divulgación, en diversas formas de realización, además proporciona composiciones que comprenden múltiples copias de tales compuestos, por ejemplo, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto farmacológico modulador de empalme y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0689] En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



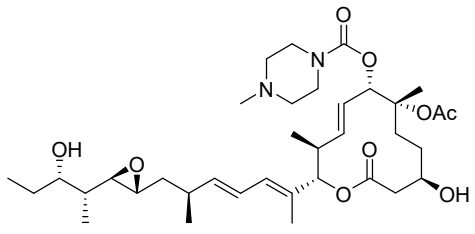
(D4) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0690] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



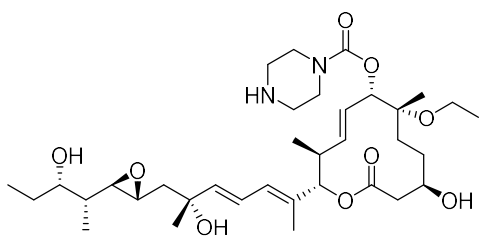
(D8) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0691] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



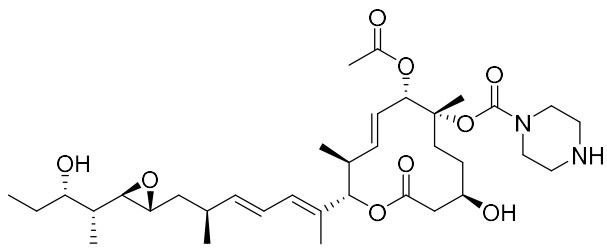
(D9) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0692] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



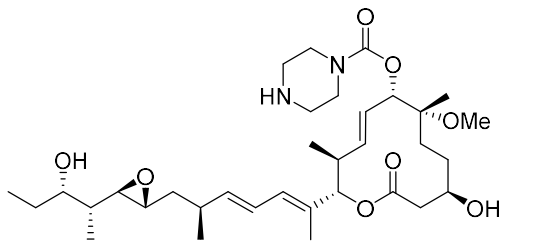
(D10) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0693] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



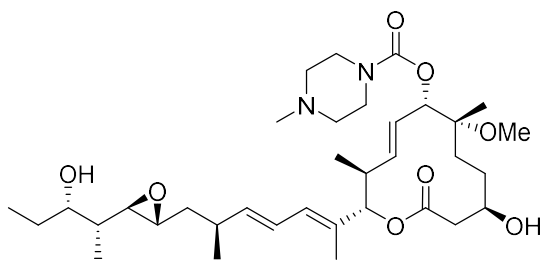
(D13) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0694] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



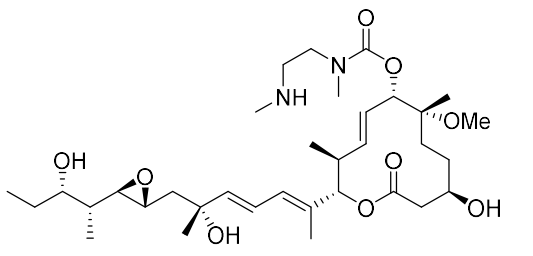
(D18) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0695] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



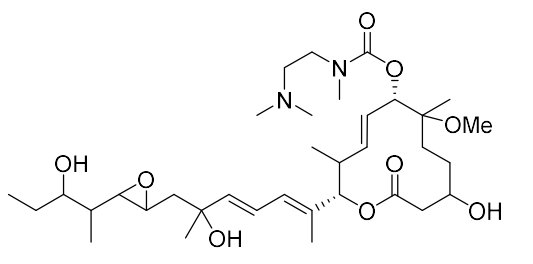
(D19) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0696] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



(D20) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

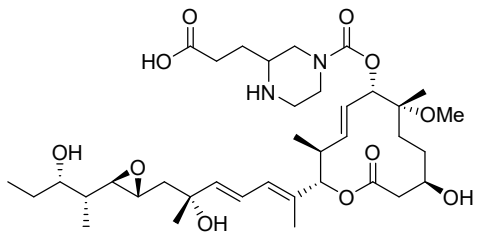
[0697] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



(D21) y sales farmacéuticamente

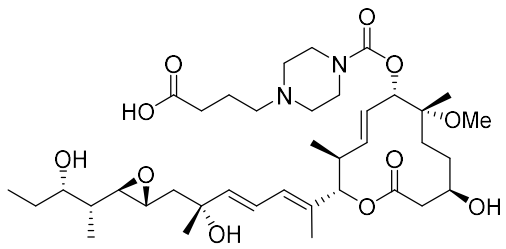
aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0698] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



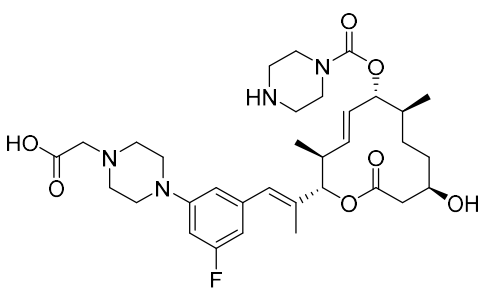
(D22) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0699] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



(D25) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0700] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un compuesto elegido de un compuesto de Fórmula



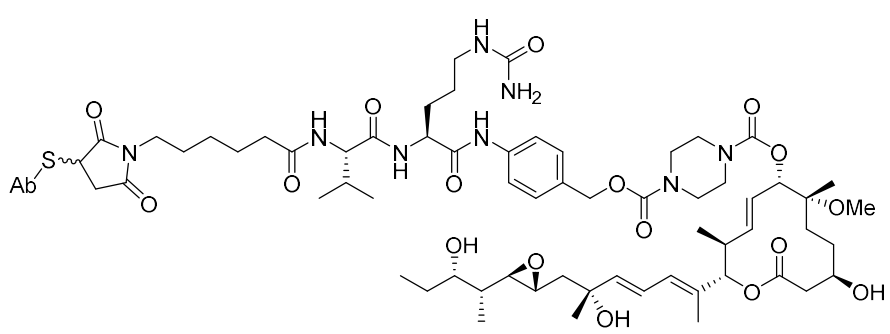
(D33) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

<u>Bioconjugación</u>

En algunas formas de realización, un compuesto enlazador-fármaco se puede conjugar con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con el esquema

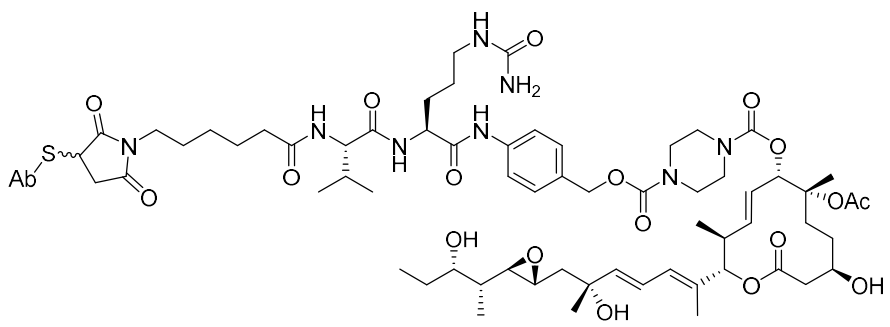
ejemplar mostrado en la **FIG. 26**. Resumiendo, en algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se puede tratar con un reactivo, por ejemplo, un agente reductor, por ejemplo, tris(2-carboxietil)fosfina, para activar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno reduciendo uno o más enlaces disulfuro. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno activado se trata a continuación con un compuesto enlazador-fármaco a una estequiometría predeterminada. Posteriormente, en algunas realizaciones, la mezcla se somete a continuación a una técnica de purificación, por ejemplo, resina de exclusión por tamaño o ultrafiltración para proporcionar el conjugado de anticuerpo-fármaco deseado.

En algunas formas de realización, en la presente se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene la estructura



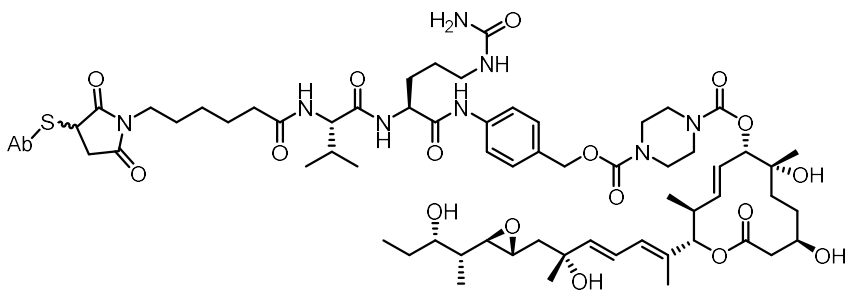
(Ab-ADL1-D1), donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido covalentemente a un grupo de maleimida del compuesto enlazador-fármaco (ADL1-D1) a través del átomo de azufre de un grupo tiol del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En algunas formas de realización, se proporciona en la presente un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la estructura



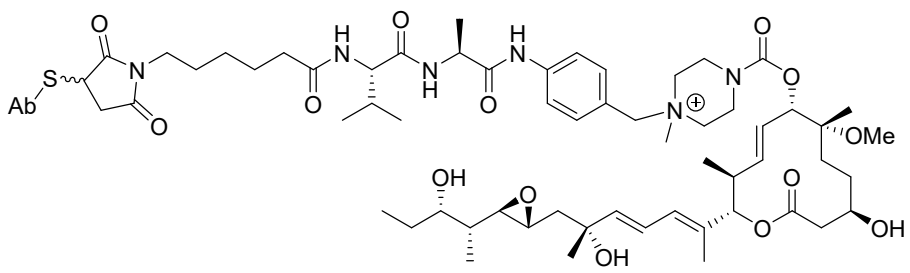
(Ab-ADL1-D4), donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido covalentemente a un grupo de maleimida del compuesto enlazador fármaco (ADL1-D4) a través del átomo de azufre de un grupo tiol del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En algunas formas de realización, en la presente se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la estructura



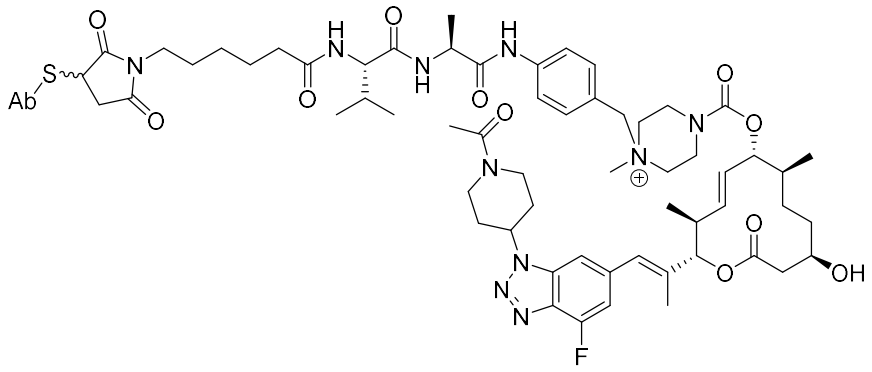
(Ab-ADL1-D12), donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido covalentemente a un grupo de maleimida del compuesto enlazador-fármaco (ADL1-D12) a través del átomo de azufre de un grupo tiol del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En algunas formas de realización, en la presente se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la estructura



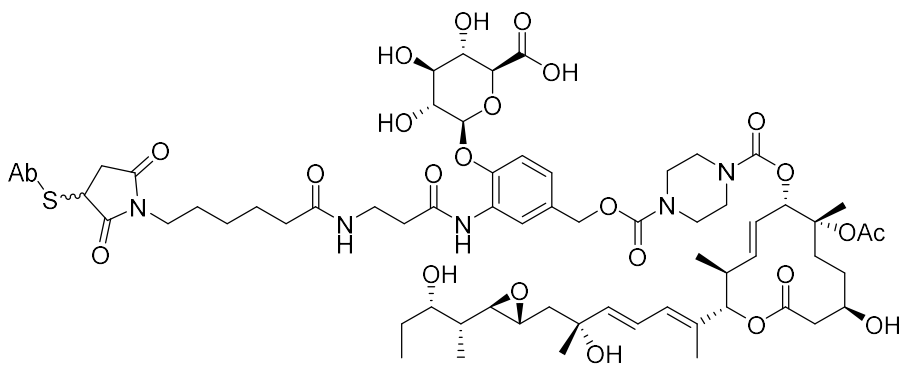
(Ab-ADL5-D2), donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido covalentemente a un grupo de maleimida del compuesto enlazador-fármaco (ADL5-D2) a través del átomo de azufre de un grupo tiol del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En algunas formas de realización, en la presente se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la estructura



(Ab-ADL5-D15), donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido covalentemente a un grupo de maleimida del compuesto enlazador-fármaco (ADL5-D15) a través del átomo de azufre de un grupo tiol en el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno.

En algunas formas de realización, en la presente se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la estructura



(Ab-ADL13-D4), donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido covalentemente a un grupo de maleimida del compuesto enlazador-fármaco (ADL13-D4) a través del átomo de azufre de un grupo tiol del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En algunas formas de realización, el Ab es un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, el Ab se une a HER2 y apunta a células neoplásicas que expresan HER2 (es decir, la ADC apunta a células neoplásicas que expresan HER2). En algunas formas de realización, el Ab es un anticuerpo anti-HER2 internalizante o un fragmento de unión a antígeno del mismo internalizante.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (HCDR1), SEQ ID NO:2 (HCDR2) y SEQ ID NO:3 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 (LCDR1), SEQ ID NO:5 (LCDR2) y SEQ ID NO:6 (LCDR3). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo internalizante o fragmento de unión a antígeno internalizante. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende secuencias de marco humanas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unón a antígeno comprende una región contante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de cadena liviana kappa de Ig humana.

Carga de fármaco

[0701] La carga de fármaco está representada por *p*, y también se denomina en

este documento como proporción de fármaco a anticuerpo (DAR). La carga de fármaco puede variar de 1 a 10 restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 1 a 10. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 o de 1 a 2. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 2 a 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 1 a 8. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de 2 a 4. En otras formas de realización, *p* es un número entero de 4 a 8. En otras formas de realización, *p* es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, preferiblemente 4 u 8.

[0702] La carga de fármaco puede estar limitada por el número de sitios de unión en el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el resto enlazador (L) del ADC se une al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un grupo químicamente activo en uno o más residuos de aminoácidos en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, el enlazador puede unirse al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un grupo amino, imino, hidroxilo, tiol o carboxilo libre (por ejemplo, al extremo N o C, al grupo amino épsilon de uno o más residuos de lisina, al grupo ácido carboxílico libre de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico, o al grupo sulfhidrilo de uno o más residuos de cisteína). El sitio al que se une el enlazador puede ser un residuo natural en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o puede introducirse en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, introduciendo un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos) o por bioquímica de proteínas (por ejemplo, por reducción, ajuste del pH o hidrólisis).

[0703] En algunas formas de realización, el número de restos farmacológicos que pueden conjugarse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está limitado por el número de residuos de cisteína libres. Por ejemplo, cuando la unión es un grupo cisteína tiol, un anticuerpo puede tener solo uno o unos pocos grupos cisteína tiol, o puede tener solo uno o unos pocos grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos cisteína tiol libres y reactivos que pueden unirse a un resto farmacológico. De hecho, la mayoría de los residuos de cisteína tiol en los anticuerpos están implicados en enlaces disulfuro entre cadenas o dentro de las cadenas. Por lo tanto, la conjugación con cisteínas puede, en algunas formas de realización, requerir al menos una reducción parcial del anticuerpo. La unión excesiva de la toxina enlazadora a un anticuerpo puede

desestabilizar el anticuerpo al reducir los residuos de cisteína disponibles para formar enlaces disulfuro. Por lo tanto, una relación óptima de fármaco:anticuerpo debería aumentar la potencia del ADC (al aumentar el número de restos farmacológicos unidos por anticuerpo) sin desestabilizar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, una relación óptima puede ser 2, 4, 6 u 8.

[0704] En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se expone a condiciones reductoras antes de la conjugación para generar uno o más residuos de cisteína libres. Un anticuerpo, en algunas formas de realización, puede reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o tris(2–carboxietil)fosfina (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos cisteína tiol reactivos. Se pueden generar cisteínas no pareadas mediante reducción parcial con equivalentes molares limitados de TCEP, que pueden reducir los enlaces disulfuro entre cadenas que unen la cadena liviana y la cadena pesada (un par por emparejamiento de H–L) y las dos cadenas pesadas en la región de bisagra (dos pares por emparejamiento de H–H en el caso de la IgG1 humana) mientras se dejan intactos los enlaces disulfuro intracatenarios (Stefano *et al.* (2013) Methods Mol Biol. 1045:145–71). En algunas formas de realización, los enlaces disulfuro dentro de los anticuerpos se reducen electroquímicamente, por ejemplo, empleando un electrodo de trabajo que aplica un voltaje de oxidación y reducción alternante. Este enfoque puede permitir el acoplamiento en línea de la reducción del enlace disulfuro a un dispositivo analítico (por ejemplo, un dispositivo de detección electroquímica, un espectrómetro de RMN o un espectrómetro de masas) o un dispositivo de separación química (por ejemplo, un cromatógrafo de líquidos (por ejemplo, una HPLC) o un dispositivo de electroforesis (véase, por ejemplo, la Publicación de EE. UU. Nro. 20140069822)). En ciertas formas de realización, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos en residuos de aminoácidos, como cisteína.

[0705] La carga de fármaco de un ADC se puede controlar de diferentes maneras, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar del intermediario enlazador–fármaco o reactivo enlazador con respecto al anticuerpo; (ii) limitando el tiempo de reacción de conjugación o la temperatura; (iii) mediante condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación de cisteína tiol; y/o (iv) por ingeniería de técnicas recombinantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, de modo que el número y la posición de los residuos de cisteína se modifiquen para controlar el número y/o la posición de los enlaces de enlazador–fármaco.

[0706] En algunas formas de realización, los residuos de cisteína libres se introducen en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos modificados con cisteína en los que uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental se reemplazan con un aminoácido cisteína. Cualquier forma de anticuerpo puede ser así diseñada, es decir, mutada. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab parental se puede diseñar para formar un Fab modificado con cisteína, denominado "ThioFab". De manera similar, un anticuerpo monoclonal parental puede diseñarse para formar un "ThioMab". Una mutación de sitio único produce un único residuo de cisteína modificado en un ThioFab, mientras que una mutación de sitio único produce dos residuos de cisteína modificados en un ThioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. El ADN que codifica una variante de la secuencia de aminoácidos del polipéptido parental puede prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, los métodos descritos en la Publicación Internacional Nro. WO 2006/034488). Estos métodos incluyen, pero sin limitaciones, la preparación por mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido. También pueden construirse variantes de anticuerpos recombinantes mediante manipulación de fragmentos de restricción o mediante PCR de extensión por solapamiento con oligonucleótidos sintéticos. Los ADC de Fórmula (I) incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos que tienen 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de cisteína diseñados por ingeniería genética (Lyon *et al.* (2012) Methods Enzymol. 502:123–38). En algunas formas de realización, uno o más residuos de cisteína libres ya están presentes en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, sin el uso de ingeniería genética, en cuyo caso los residuos de cisteína libre existentes pueden usarse para conjugar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a un resto farmacológico.

[0707] Cuando más de un grupo nucleofílico reacciona con un intermediario de fármaco–enlazador o un reactivo de resto enlazador seguido de un reactivo de resto farmacológico, en una mezcla de reacción que comprende copias múltiples del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y resto enlazador, entonces el producto resultante puede ser una mezcla de compuestos ADC con una distribución de uno o más restos farmacológicos unidos a cada copia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en la mezcla. En algunas formas de realización, la carga de fármaco en una mezcla de ADC que resulta de una reacción de conjugación varía de 1 a 10 restos farmacológicos unidos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. El número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (es decir, la carga de fármaco promedio o el valor *p* promedio) puede calcularse mediante cualquier método convencional conocido en la técnica, por ejemplo, mediante espectrometría de masas (por ejemplo, LC–MS en fase inversa) y/o cromatografía líquida de alto rendimiento (por

ejemplo, HIC–HPLC). En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se determina mediante cromatografía de interacción hidrófoba–cromatografía líquida de alto rendimiento (HIC–HPLC). En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se determina mediante cromatografía líquida en fase inversa–espectrometría de masas (LC–MS). En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3.5, de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 4.5, de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 5.5, de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 6.5, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.5, de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.5, o de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 9.5. En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 8.

[0708] En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es aproximadamente 2. En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.6, aproximadamente 1.7, aproximadamente 1.8, aproximadamente 1.9, aproximadamente 2, aproximadamente 2.1, aproximadamente 2.2, aproximadamente 2.3, aproximadamente 2.4 o aproximadamente 2.5. En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es 2.

[0709] En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es aproximadamente 4. En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es aproximadamente 3.5, aproximadamente 3.6, aproximadamente 3.7, aproximadamente 3.8, aproximadamente 3.9, aproximadamente 4, aproximadamente 4.1, aproximadamente 4.2, aproximadamente 4.3, aproximadamente 4.4 o aproximadamente 4.5. En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es 4.

[0710] En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es aproximadamente 8. En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es aproximadamente 7.5, aproximadamente 7.6, aproximadamente 7.7, aproximadamente 7.8, aproximadamente 7.9, aproximadamente 8, aproximadamente 8.1, aproximadamente 8.2, aproximadamente 8.3, aproximadamente 8.4 o aproximadamente 8.5. En algunas formas de realización, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es 8.

[0711] En diversas formas de realización, el término "aproximadamente", tal como se usa con respecto al número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, significa más o menos 10%.

[0712] Los compuestos ADC individuales, o "especies", pueden identificarse en la mezcla mediante espectroscopia de masas y separarse mediante UPLC o HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC–HPLC). En ciertas formas de realización, un producto de ADC homogéneo o casi homogéneo con un solo valor de carga puede aislarse de la mezcla de conjugación, por ejemplo, mediante electroforesis o cromatografía.

[0713] En algunas formas de realización, una mayor carga del fármaco (por ejemplo, p >8) puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo–fármaco. Una mayor carga de fármaco también puede afectar negativamente la farmacocinética (por ejemplo, la eliminación) de ciertos ADC. En algunas formas de realización, una menor carga de fármaco (por ejemplo, p <2) puede reducir la potencia de ciertos ADC contra células que expresan el blanco y/o células espectadoras. En algunas formas de realización, la carga de fármaco para un ADC de la presente divulgación varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 2 a aproximadamente 5; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; de aproximadamente 2 a aproximadamente 4; o de aproximadamente 4 a aproximadamente 8.

[0714] En algunas formas de realización, se logra una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de aproximadamente 2, por ejemplo, usando una reducción parcial de disulfuros intracatenarios en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, lo que proporciona propiedades beneficiosas. En algunas formas de realización, se logra una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de aproximadamente 4, por ejemplo, usando una reducción parcial de disulfuros intracatenarios en el anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno, lo que proporciona propiedades beneficiosas. En algunas formas de realización, se logra una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de aproximadamente 8, por ejemplo, usando una reducción parcial de disulfuros intracatenarios en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, lo que proporciona propiedades beneficiosas. En algunas formas de realización, una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de menos de aproximadamente 2 puede dar como resultado un nivel inaceptablemente alto de especies de anticuerpos no conjugados, que pueden competir con el ADC para unirse al antígeno blanco y/o proporcionar una eficacia del tratamiento reducida. En algunas formas de realización, una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de más de aproximadamente 8 puede dar como resultado un nivel inaceptablemente alto de heterogeneidad del producto y/o agregación del ADC. Una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de más de aproximadamente 8 también puede afectar la estabilidad del ADC, debido a la pérdida de uno o más enlaces químicos necesarios para estabilizar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno.

[0715] La presente divulgación incluye métodos para producir los ADC descritos. Brevemente, los ADC comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, un resto de fármaco (por ejemplo, un modulador de empalme) y un enlazador que une el resto de fármaco y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, los ADC pueden prepararse usando un enlazador que tiene funcionalidades reactivas para unirse covalentemente al resto de fármaco y al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una cisteína tiol de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede formar un enlace con un grupo funcional reactivo de un enlazador o un intermediario de fármaco–enlazador (por ejemplo, un resto maleimida) para hacer un ADC. La generación de los ADC puede realizarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en el arte.

[0716] En algunas formas de realización, un ADC se produce al poner en contacto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con un enlazador y un resto de fármaco (por ejemplo, un modulador de empalme) de manera secuencial, de modo tal que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se una covalentemente al enlazador primero y luego el intermediario de anticuerpo–enlazador formado previamente reaccione con el resto de fármaco. El intermediario de anticuerpo–enlazador puede someterse o no a una etapa de purificación antes de poner en contacto el resto de fármaco. En otras formas de realización, un ADC se produce poniendo en contacto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con un compuesto de enlazador–fármaco formado previamente haciendo reaccionar un enlazador con un resto de fármaco. El compuesto enlazador–fármaco

formado previamente puede someterse o no a una etapa de purificación antes de poner en contacto el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se pone en contacto con el enlazador y el resto de fármaco en una mezcla de reacción, permitiendo la formación simultánea de los enlaces covalentes entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el enlazador, y entre el enlazador y el resto de fármaco. Este método para producir ADC puede incluir una reacción, en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se pone en contacto con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno antes de la adición del enlazador a la mezcla de reacción, y viceversa. En ciertas formas de realización, un ADC se produce haciendo reaccionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con un enlazador unido a un resto de fármaco, como el ADL1–modulador de empalme (por ejemplo, D1) o el ADL5–modulador de empalme (por ejemplo, D2), en condiciones que permitan su conjugación.

[0717] Los ADC preparados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente pueden someterse a una etapa de purificación. La etapa de purificación puede implicar cualquier método bioquímico conocido en la técnica para purificar proteínas, o cualquier combinación de métodos de los mismos. Estos incluyen, pero sin limitaciones, filtración de flujo tangencial (TFF), cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cualquier cromatografía basada en carga o punto isoeléctrico, cromatografía de modo mixto, por ejemplo, CHT (hidroxiapatita cerámica), cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía por exclusión de tamaño, diálisis, filtración, precipitación selectiva o cualquier combinación de los mismos.

Usos terapéuticos y composiciones

[0718] En el presente documento se divulgan métodos para usar los ADC y las composiciones divulgadas para tratar a un sujeto por un trastorno, por ejemplo, un trastorno neoplásico. Los ADC pueden administrarse solos o en combinación con un segundo agente terapéutico, y pueden administrarse en cualquier formulación, dosificación y régimen posológico farmacéuticamente aceptable. La eficacia del tratamiento con ADC puede evaluarse en cuanto a su toxicidad, así como en cuanto a los indicadores de eficacia, y ajustarse en consecuencia. Las medidas de eficacia incluyen, pero sin limitaciones, un efecto citostático y/o citotóxico observado *in vitro* o *in vivo*, volumen tumoral reducido, inhibición del crecimiento tumoral y/o sobrevida prolongada.

[0719] Se conocen métodos para determinar si un ADC ejerce un efecto citostático y/o citotóxico en una célula. Por ejemplo, la actividad citotóxica o citostática de un ADC puede medirse: exponiendo células de mamíferos que expresan una proteína blanco del ADC en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un período de

aproximadamente 6 horas a aproximadamente 6 días; y midiendo la viabilidad celular. También se pueden usar ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de apoptosis (activación de caspasa) del ADC.

[0720] Para determinar si un ADC ejerce un efecto citostático, se puede usar un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células cancerosas que expresan un antígeno blanco a una densidad de 5.000 células/cavidad de una de 96 cavidades se pueden cultivar durante un período de 72 horas y exponer a 0.5 µCi de ^{3}H–timidina durante las 8 horas finales del período de 72 horas. La incorporación de ^{3}H–timidina en las células del cultivo se mide en presencia y ausencia del ADC.

[0721] Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis suele ir acompañada de un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática; hinchazón de la célula y rotura de la membrana plasmática. La apoptosis se puede cuantificar, por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN. Se dispone de métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de tales ensayos, que incluyen TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en el ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica (1999) Nro. 2, páginas 34–37 (Roche Molecular Biochemicals).

[0722] La apoptosis también se puede determinar midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, al igual que con la necrosis, la pérdida de integridad de la membrana plasmática puede determinarse midiendo la captación de ciertos colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan *et al.*, eds. (1992) pp. 3.17.1–3.17.16). Las células también pueden marcarse con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y se pueden observar las células en cuanto a la condensación y marginación de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear interna. La apoptosis también se puede determinar, en algunas formas de realización, mediante la detección de la actividad de caspasa. En algunas formas de realización, se puede usar un ensayo Caspase–Glo® para medir la actividad de caspasa–3 y caspasa–7. En algunas formas de realización, el ensayo proporciona un sustrato luminogénico de caspasa–3/7 en un reactivo optimizado para la actividad de caspasa, la actividad de luciferasa y la lisis celular. En algunas formas de realización, la adición de reactivo Caspase–Glo® 3/7 en un formato de "adición–mezcla–medición" puede resultar en lisis celular, seguida de la escisión de la caspasa del sustrato y

la generación de una señal luminiscente de "tipo incandescente", producida por luciferasa. En algunas formas de realización, la luminiscencia puede ser proporcional a la cantidad de actividad de caspasa presente, y puede servir como indicador de apoptosis. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplásmica, aumento de ampollas en la membrana y contracción celular. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células cancerosas indica que un ADC es útil en el tratamiento de los cánceres.

[0723] La viabilidad celular puede medirse, por ejemplo, determinando en una célula la captación de un colorante como el rojo neutro, el azul de tripano, el violeta de cristal o el azul ALAMAR™ (véase, por ejemplo, Page *et al.* (1993) Intl J Oncology 3:473–6). En dicho ensayo, las células se incuban en medios que contienen el colorante, las células se lavan, y el colorante restante, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. La viabilidad celular también se puede medir, por ejemplo, cuantificando ATP, un indicador de células metabólicamente activas. En ciertas formas de realización, la potencia *in vitro* y/o la viabilidad celular de los ADC preparados o los compuestos moduladores de empalme pueden evaluarse utilizando un ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter–Glo®, como se describe en los ejemplos proporcionados en este documento. En este ensayo, en ciertas formas de realización, el reactivo único (reactivo CellTiter–Glo®) se agrega directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero. La adición del reactivo causa la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El colorante de unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) también se puede usar para medir la citotoxicidad (Skehan *et al.* (1990) J Natl Cancer Inst. 82:1107–12).

[0724] Los ADC divulgados también pueden ser evaluados para determinar la actividad de destrucción adicional. La actividad de destrucción adicional puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo que emplea dos líneas celulares, una positiva para un antígeno blanco y una negativa para un antígeno blanco. En ciertas formas de realización, el diseño del ensayo permite el seguimiento de solo las células negativas blanco. En ciertas formas de realización, las células se colocan en placas en tres condiciones: (i) células negativas blanco solas (etiquetadas o marcadas); (ii) células positivas blanco solas; y (iii) cocultivo de células negativas blanco y células positivas blanco. Las células luego se tratan con un ADC seguido del monitoreo de la citotoxicidad. Cuando se leen las placas con el reactivo CellTiter–Glo®, se puede monitorear la viabilidad de todas las poblaciones de células. Cuando se leen las placas con el reactivo OneGlo®, solo las células negativas blanco etiquetadas o marcadas producen

una señal. La destrucción de las células negativas blanco cuando se mezclan con células positivas blanco es indicativa de la destrucción adicional, mientras que la destrucción de las células negativas blanco en ausencia de las células positivas blanco es indicativa de destrucción fuera de blanco.

[0725] En ciertos aspectos, la presente divulgación presenta un método para destruir, inhibir o modular el crecimiento, o interferir con el metabolismo, de una célula o tejido canceroso al interrumpir el empalme del ARN. El método se puede utilizar con cualquier sujeto en el que la interrupción del empalme del ARN proporcione un beneficio terapéutico. Los sujetos que pueden beneficiarse de la interrupción del empalme del ARN incluyen, entre otros, los que tienen o corren el riesgo de tener un trastorno neoplásico, como una neoplasia maligna hematológica o un tumor sólido. En ciertas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica es una neoplasia maligna de células B, un cáncer de la sangre (leucemia), un cáncer de células plasmáticas (mieloma, por ejemplo, mieloma múltiple) o un cáncer de los ganglios linfáticos (linfoma). En ciertas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica es leucemia mielógena aguda o mieloma múltiple. En ciertas formas de realización, la leucemia es leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), c leucemia mielomonocítica crónica (CMML) o leucemia monocítica aguda (AMoL). En ciertas formas de realización, el linfoma es linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin. En ciertas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica es síndrome de mielodisplasia (MDS). En ciertas formas de realización, el tumor sólido es un carcinoma tal como cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon o colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cérvix, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, colangiocarcinoma, glioma o melanoma. En ciertas formas de realización, el tumor sólido es cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial seroso uterino), carcinoma del conductos salivales, melanoma, cáncer de colon, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de esófago. En ciertas formas de realización, el cáncer de pulmón es adenocarcinoma de pulmón. En ciertas formas de realización, el cáncer de útero es carcinoma endometrial seroso uterino.

[0726] En diversas formas de realización, los ADC divulgados pueden administrarse en cualquier célula o tejido que exprese HER2, tal como una célula o tejido neoplásico que exprese HER2. Una forma de realización ejemplar incluye un método para inhibir la señalización celular mediada por HER2 o un método para destruir una célula. El método se puede utilizar con cualquier célula o tejido que exprese HER2, como una célula cancerosa

o una lesión metastásica. Los ejemplos no limitativos de cánceres que expresan HER2 incluyen cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma de células uroteliales, cáncer de esófago, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial seroso uterino), carcinoma de conductos salivales, cáncer cervical, cáncer de endometrio y cáncer de ovario (English *et al.* (2013) Mol Diagn Ther. 17:85–99). Los ejemplos no limitantes de células que expresan HER2 incluyen células de carcinoma ductal de mama humano HCC1954 y SKBR3, células de carcinoma gástrico humano N87 y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica HER2 o una porción del mismo.

[0727] En diversas formas de realización, los ADC divulgados pueden administrarse en cualquier célula o tejido que exprese CD138, tal como una célula o tejido neoplásico que exprese CD138. Una forma de realización ejemplar incluye un método para inhibir la señalización celular mediada por CD138 o un método para destruir una célula. El método puede usarse con cualquier célula o tejido que exprese CD138, como una célula cancerosa o una lesión metastásica. Los ejemplos no limitantes de cánceres que expresan CD138 incluyen cáncer intratorácico (por ejemplo, cáncer de pulmón, mesotelioma), cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, de laringe, hipofaringe, nasofaringe), cáncer de mama, cáncer urogenital (por ejemplo, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer urotelial), neoplasias malignas hematológicas (por ejemplo, mieloma como el mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin) y cáncer de tiroides (Szatmári *et al.* (2015) Dis Markers 2015:796052). Los ejemplos no limitantes de células que expresan CD138 incluyen células de mieloma múltiple humanas MOLP8 y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica CD138 o una porción del mismo.

[0728] En diversas formas de realización, los ADC divulgados pueden administrarse en cualquier célula o tejido que exprese EPHA2, tal como una célula o tejido neoplásico que exprese EPHA2. Una forma de realización ejemplar incluye un método para inhibir la señalización celular mediada por EPHA2 o un método para destruir una célula. El método se puede utilizar con cualquier célula o tejido que exprese EPHA2, como una célula cancerosa o una lesión metastásica. Los ejemplos no limitantes de cánceres que expresan EPHA2 incluyen cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de esófago y cáncer gástrico (Tandon *et al.* (2011) Expert Opin Ther Targets 15(1):31–51. Los ejemplos no limitantes de células que expresan EPHA2 incluyen células de cáncer de próstata humano PC3 y células que comprenden un ácido nucleico

recombinante que codifica EPHA2 o una porción del mismo.

[0729] Los métodos ejemplares incluyen los pasos de poner en contacto una célula con un ADC, como se describe en este documento, en una cantidad efectiva, es decir, una cantidad suficiente para matar la célula. El método se puede utilizar en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro, in vivo, ex vivo* o *in situ.* Por ejemplo, las células que expresan HER2 (por ejemplo, células recolectadas mediante biopsia de un tumor o lesión metastásica; células de una línea celular de cáncer establecida; o células recombinantes) pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y el paso de contacto puede verse afectado agregando el ADC al medio de cultivo. El método dará como resultado la muerte de células que expresan HER2, incluidas en particular las células tumorales que expresan HER2. Alternativamente, el ADC puede administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración adecuada (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o por contacto directo con un tejido tumoral) para tener un efecto *in vivo*. Este enfoque puede usarse para anticuerpos dirigidos a otros antígenos de la superficie celular (por ejemplo, CD138, EPHA2).

[0730] El efecto *in vivo* de una composición terapéutica de ADC divulgada puede evaluarse en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, se pueden usar modelos de cáncer xenogénico, en los que se introducen explantes de cáncer o tejidos de xenoinjerto de pasaje en animales inmunocomprometidos, como ratones desnudos o SCID (Klein *et al.* (1997) Nature Med. 3:402–8). La eficacia se puede predecir mediante ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, la regresión o metástasis tumoral, y similares.

[0731] También se pueden usar ensayos *in vivo* que evalúan la promoción de la muerte del tumor por mecanismos como la apoptosis. En una forma de realización, los xenoinjertos de ratones portadores de tumores tratados con la composición terapéutica pueden examinarse en busca de la presencia de focos apoptóticos y compararlos con ratones portadores de xenoinjertos de control sin tratar. El grado en que se encuentran focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados proporciona una indicación de la eficacia terapéutica de la composición.

[0732] Además, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar un trastorno neoplásico, por ejemplo, un cáncer. Los ADC divulgados en este documento pueden administrarse a un mamífero no humano o un sujeto humano con fines terapéuticos. Los métodos terapéuticos implican administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC o una composición que comprende un modulador de empalme unido a un anticuerpo dirigido que se une a un antígeno expresado, es accesible al enlace o se localiza en una superficie de células cancerosas. En algunas formas de realización, el tratamiento con el

conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce la destrucción adicional de células neoplásicas que no expresan un antígeno blanco, pero son adyacentes a las células neoplásicas que expresan un antígeno blanco.

[0733] Una forma de realización ejemplar es un método para administrar un modulador de empalme a una célula que expresa HER2, que comprende conjugar el modulador de empalme a un anticuerpo que se une de forma inmunoespecífica a un epítopo HER2 y exponer la célula al ADC. Las células tumorales ejemplares que expresan HER2 para las que se indican los ADC de la presente divulgación incluyen células de carcinoma gástrico y células de carcinoma ductal de mama.

[0734] Otra forma de realización ejemplar es un método para administrar un modulador de empalme a una célula que expresa CD138, que comprende conjugar el modulador de empalme a un anticuerpo que se une de forma inmunoespecífica a un epítopo CD138 y exponer la célula al ADC. Las células tumorales ejemplares que expresan CD138 para las que se indican los ADC de la presente divulgación incluyen células de mieloma múltiple.

[0735] Otra forma de realización ejemplar es un método para administrar un modulador de empalme a una célula que expresa EPHA2, que comprende conjugar el modulador de empalme a un anticuerpo que se une de forma inmunoespecífica a un epítopo EPHA2 y exponer la célula al ADC. Las células tumorales ejemplares que expresan EPHA2 para las que se indican los ADC de la presente divulgación incluyen células de cáncer de próstata.

[0736] Otra forma de realización ejemplar es un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor (por ejemplo, un tumor que expresa HER2, un tumor que expresa CD138, un tumor que expresa EPHA2), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC o una composición que comprende un ADC. En algunas formas de realización, el tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del paciente, reducir el número o el tamaño de las lesiones metastásicas, reducir la carga tumoral, reducir la carga tumoral primaria, reducir la invasividad, prolongar el tiempo de sobrevida y/o mantener o mejorar la calidad de vida. En algunas formas de realización, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del ADC (por ejemplo, un anticuerpo anti–HER2, un anticuerpo anti–CD138, un anticuerpo anti–EPHA2) cuando se administra solo, y/o el tumor es resistente o refractario al tratamiento con el resto de fármaco modulador de empalme cuando se administra solo.

[0737] En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa HER2. En ciertas formas de

realización, el tratamiento con el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce la destrucción adicional de células tumorales que no expresan HER2, pero que son adyacentes a las células tumorales neoplásicas que expresan HER2. Los tipos de tumores que expresan HER2 ejemplares incluyen, entre otros, tumores derivados de un cáncer de mama que expresa HER2, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, carcinoma de células uroteliales, cáncer de esófago, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial seroso uterino), carcinoma de conductos salivales, cáncer cervical, cáncer de endometrio y cáncer de ovario. En ciertas formas de realización, el tumor que expresa HER2 es un tumor derivado de un cáncer de mama que expresa HER2, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial seroso uterino), osteosarcoma o carcinoma de conductos salivales. En ciertas formas de realización, el tumor que expresa HER2 es un adenocarcinoma de pulmón o carcinoma endometrial seroso uterino.

[0738] En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa CD138. En ciertas formas de realización, el tratamiento con el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce la destrucción adicional de células tumorales que no expresan CD138, pero que son adyacentes a las células tumorales neoplásicas que expresan CD138. Los tipos de tumores que expresan CD138 ejemplares incluyen, entre otros, tumores derivados de un cáncer intratorácico que expresa CD138 (por ejemplo, cáncer de pulmón, mesotelioma), cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, de laringe, hipofaringe, nasofaringe), cáncer de mama, cáncer urogenital (por ejemplo, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer urotelial) y cáncer de tiroides.

[0739] En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa EPHA2. En ciertas formas de realización, el tratamiento con el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce la destrucción adicional de células tumorales que no expresan EPHA2, pero que son adyacentes a las células tumorales neoplásicas que expresan EPHA2. Los tipos de tumores que expresan EPHA2 ejemplares incluyen, entre otros, tumores derivados de un cáncer de mama que expresa PHA2, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de esófago y cáncer gástrico. En ciertas formas de realización, el tumor que expresa EPHA2 es un tumor derivado de un cáncer de mama que expresa EPHA2, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de colon o cáncer de esófago.

[0740] Además, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden administrar a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que el ADC es capaz de unirse con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los ADC divulgados (por ejemplo, pruebas de dosis y tiempos de administración).

[0741] Además, en la presente memoria se proporcionan usos terapéuticos de los ADC y las composiciones divulgadas. Una forma de realización ejemplar es el uso de un ADC en el tratamiento de un trastorno neoplásico (por ejemplo, un cáncer que expresa HER2, un cáncer que expresa CD138, un cáncer que expresa EPHA2). Otra forma de realización ejemplar es un ADC para usar en el tratamiento de un trastorno neoplásico (por ejemplo, un cáncer que expresa HER2, un cáncer que expresa CD138, un cáncer que expresa EPHA2). Los métodos para identificar sujetos que tienen cánceres que expresan un antígeno blanco (por ejemplo, HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4, STEAP1) son conocidos en la técnica y se pueden usar para identificar pacientes adecuados para el tratamiento con un ADC divulgado.

[0742] Otra forma de realización ejemplar es el uso de un ADC en un método para elaborar un medicamento para el tratamiento de un trastorno neoplásico (por ejemplo, un cáncer que expresa HER2, un cáncer que expresa CD138, un cáncer que expresa EPHA2).

[0743] Las composiciones terapéuticas utilizadas en la práctica de los métodos anteriores pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para el método de administración deseado. Una forma de realización ejemplar es una composición farmacéutica que comprende un ADC de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con la composición terapéutica, retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y generalmente no es reactivo con el sistema inmunitario del paciente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, sal de mesilato y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, se incluyen agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente

aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia del ADC.

[0744] Las formulaciones terapéuticas pueden solubilizarse y administrarse por cualquier vía capaz de suministrar la composición terapéutica al sitio del tumor. Las vías de administración potencialmente eficaces incluyen, pero sin limitaciones, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraorgánica, ortotópica y similares. Las preparaciones de proteínas terapéuticas pueden liofilizarse y almacenarse como polvos estériles, por ejemplo, al vacío, y luego reconstituirse en agua bacteriostática (que contiene, por ejemplo, conservante de alcohol bencílico) o en agua estéril antes de la inyección. Las formulaciones terapéuticas pueden comprender un ADC o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por ejemplo, una sal de mesilato.

[0745] En algunas formas de realización, el ADC se administra al paciente diariamente, cada dos meses o cualquier período de tiempo intermedio. Las dosis y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres utilizando los métodos anteriores variarán con el método y el cáncer objetivo, y en general dependerán de una serie de otros factores apreciados en la técnica.

[0746] Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden usar para administrar uno o más ADC de la presente divulgación. Los métodos de administración de los ADC incluyen, pero sin limitaciones, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración mucosal (por ejemplo, vías intranasal y oral). Además, se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización. Véase, por ejemplo, las composiciones y métodos para administración pulmonar descritos en las patentes de EE. UU. Nros. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las Publicaciones Internacionales Nros. WO 1992/019244, WO 1997/032572, WO 1997/044013, WO 1998/031346 y WO 1999/066903. Los ADC pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, o por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local.

[0747] Las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden ser estériles y estables en las condiciones de elaboración y almacenamiento. En algunas formas de realización, uno o más de los ADC, o las composiciones farmacéuticas, se suministran como polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado sin agua en un

recipiente herméticamente sellado, y se pueden reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En algunas formas de realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas se suministran como polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado en una dosis unitaria de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg, o cualquier cantidad entre ellos. En algunas formas de realización, los ADC o las composiciones farmacéuticas liofilizadas se almacenan entre 2 °C y 8 °C en el envase original. En algunas formas de realización, uno o más de los ADC o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado, por ejemplo, un recipiente que indica la cantidad y la concentración del agente. En algunas formas de realización, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado de al menos 0.25 mg/ml, al menos 0.5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml de ADC. La forma líquida se puede almacenar entre 2 °C y 8 °C en el envase original.

[0748] En algunas formas de realización, los ADC divulgados pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. La solución inyectable puede estar compuesta de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un frasco o vial de color ámbar, una ampolla o jeringa precargada, u otro dispositivo de administración o almacenamiento conocido.

[0749] Las composiciones descritas en el presente documento pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica prevista.

[0750] En diversas formas de realización, el tratamiento implica un bolo único o la administración repetida de la preparación de ADC a través de una vía de administración aceptable.

[0751] Los pacientes pueden ser evaluados para determinar los niveles de antígeno blanco en una muestra determinada (por ejemplo, los niveles de células que expresan el antígeno blanco) para ayudar a determinar el régimen de dosificación más efectivo, etc. Una forma de realización ejemplar es un método para determinar si un paciente responderá al tratamiento con un ADC de la presente divulgación, que

comprende proporcionar una muestra biológica del paciente y poner en contacto la muestra biológica con el ADC. Las muestras biológicas ejemplares incluyen tejidos o líquidos corporales, como un exudado inflamatorio, sangre, suero, líquido intestinal, muestra de heces o biopsia de tumor (por ejemplo, una biopsia de tumor derivada de un paciente que tiene o está en riesgo de tener un cáncer que expresa el antígeno blanco), por ejemplo un cáncer que expresa HER2, un cáncer que expresa CD138, un cáncer que expresa EPHA2). En algunas formas de realización, se puede obtener una muestra (por ejemplo, un tejido y/o fluido corporal) de un sujeto, y se puede usar un método inmunológico adecuado para detectar y/o medir la expresión de proteínas del antígeno blanco (por ejemplo, HER2, CD138, EPHA2, MSLN, FOLH1, CDH6, CEACAM5, CFC1B, ENPP3, FOLR1, HAVCR1, KIT, MET, MUC16, SLC39A6, SLC44A4, STEAP1). Dichas evaluaciones también se utilizan con fines de monitoreo a lo largo de la terapia, y son útiles para medir el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros parámetros.

[0752] En algunas formas de realización, la eficacia de un ADC puede evaluarse poniendo en contacto una muestra de tumor de un sujeto con el ADC y evaluando la tasa de crecimiento o el volumen del tumor. En algunas formas de realización, cuando se ha determinado que un ADC es efectivo, puede administrarse al sujeto.

[0753] Los enfoques terapéuticos anteriores se pueden combinar con cualquiera de una amplia variedad de regímenes adicionales de cirugía, quimioterapia o radioterapia. En algunas formas de realización, los ADC o las composiciones divulgadas en el presente documento se formulan conjuntamente y/o se administran conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas nitrogenadas, compuestos de etilenimina y alquilsulfonatos; antimetabolitos, por ejemplo, antagonistas de ácido fólico, purina o pirimidina; agentes antimitóticos, por ejemplo, agentes antitubulina tales como eribulina o mesilato de eribulina (Halaven™), alcaloides de la vinca y auristatinas; antibióticos citotóxicos; compuestos que dañan o interfieren con la expresión o replicación del ADN, por ejemplo, enlazadores de surco menor del ADN; y antagonistas del receptor del factor de crecimiento. En algunas formas de realización, un agente quimioterapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, entre otros, agentes antimitóticos, como eribulina o mesilato de eribulina (Halaven™), auristatinas (por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF)), maitansinoides (por ejemplo, maitansina), dolastatinas, duostatinas, criptoficinas, alcaloides de vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina), taxanos, taxoles y colchicinas;

antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, dihidroxiantracindiona); antibióticos citotóxicos (por ejemplo, mitomicinas, actinomicinas, duocarmicinas (por ejemplo, CC–1065), auromicinas, duomicinas, caliquimicinas, endomicinas, fenomicinas); agentes alquilantes (por ejemplo, cisplatino); agentes intercalantes (por ejemplo, bromuro de etidio); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, etopósido, tenopósido); radioisótopos, tales como At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212} o ^{213}, P^{32}, e isótopos radiactivos de lutecio (por ejemplo, Lu^{177}); y toxinas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal (por ejemplo, ricina (por ejemplo, cadena A de ricina), toxina diftérica, exotoxina A de *Pseudomonas* (por ejemplo, PE40), endotoxina, mitogelina, combrestatina, restocina, gelonina, alfa–sarcina, abrina (por ejemplo, cadena A de abrina), modecina (por ejemplo, cadena A de modecina), curicina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, glucocorticoide).

[0754] En el presente documento también se describen usos de uno o más de los ADC divulgados en la elaboración de un medicamento para tratar el cáncer, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. En algunas formas de realización, los ADC divulgados en este documento se usan para tratar el cáncer, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

[0755] En diversas formas de realización, los kits para usar en el laboratorio y las aplicaciones terapéuticas descritas en este documento están dentro del alcance de la presente divulgación. Dichos kits pueden comprender un portador, paquete o contenedor que está compartimentado para recibir uno o más recipientes, tales como viales, tubos y similares, cada uno de los cuales comprende uno de los elementos separados que se utilizarán en un método divulgado aquí, junto con una etiqueta o prospecto que comprende instrucciones de uso, tal como un uso descrito en este documento. Los kits pueden comprender un recipiente que comprende un resto de fármaco. La presente divulgación también proporciona uno o más de los ADC, o composiciones farmacéuticas de los mismos, envasados en un recipiente herméticamente sellado, como una ampolla o sachet, que indica la cantidad del agente.

[0756] Los kits pueden comprender el recipiente descrito anteriormente, y uno o más recipientes asociados con el mismo que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; vehículo, paquete, envase, vial y/o etiquetas del tubo que enumera el contenido y/o las instrucciones de uso, y prospectos con las instrucciones de uso.

[0757] Una etiqueta puede estar presente en o con el recipiente para indicar que la composición se utiliza para una terapia específica o una aplicación no terapéutica, como una aplicación de pronóstico, profilaxis, diagnóstico o de laboratorio. Una etiqueta

también puede indicar instrucciones para el uso *in vivo* o *in vitro*, como las que se describen en este documento. Las instrucciones y otra información también pueden incluirse en un prospecto o etiqueta que se incluye con o en el kit. La etiqueta puede estar en o asociada con el recipiente. Una etiqueta puede estar en un envase cuando las letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta están moldeados o grabados en el recipiente. Una etiqueta puede asociarse con un recipiente cuando está presente dentro de un receptáculo o portador que también contiene el envase, por ejemplo, como un prospecto. La etiqueta puede indicar que la composición se utiliza para diagnosticar o tratar una afección, como un cáncer que se describe en el presente documento.

Neoantígenos y métodos de uso

[0758] También se divulgan en el presente documento, en diversas formas de realización, métodos para tratar a un paciente induciendo neoantígenos en células tumorales que pueden ser atacados por el sistema inmunitario del paciente para su eliminación. Sin limitarse a ninguna teoría, en diversas formas de realización, la administración de un modulador de empalme, solo y/o como parte de un ADC o composición, puede producir neoantígenos que inducen una respuesta inmune, inducen una respuesta inmune de ARN de doble cadena, por ejemplo, como resultado de retrovirus endógenos reexpresados que residen en el intrón, y/o producen neoantígenos que inducen la muerte de células inmunogénicas.

[0759] Tal como se usa en el presente documento, el término "neoantígeno" se refiere a cualquier antígeno al que el sistema inmunitario no haya estado expuesto previamente, que surja de una o más mutaciones específicas del tumor y/o de la exposición de un tumor a un fármaco (por ejemplo, uno o más de los moduladores de empalme divulgados aquí, solo y/o como parte de un ADC o composición). Las mutaciones específicas del tumor pueden incluir mutaciones sin sentido, cambios de marco, translocaciones y variantes de empalme del ARNm, así como mutaciones que influyen en el procesamiento posterior a la traducción, como la fosforilación y la glucosilación. Estas mutaciones ejemplares, en diversas formas de realización, pueden derivarse de cambios codificantes no sinónimos y/o mutaciones que alteran el procesamiento del ARNm (por ejemplo, empalme). Todas estas mutaciones ejemplares, en diversas formas de realización, pueden dar como resultado cambios moleculares que pueden ser discriminados por un receptor de células T apropiado. En diversas formas de realización preferidas, un neoantígeno ejemplar es un neoantígeno inducido por el suministro de un modulador de empalme, solo y/o como parte de un ADC o composición. En diversas formas de realización, el suministro de un modulador de empalme (por ejemplo, uno o más de los moduladores de empalme divulgados en el presente documento) puede

inducir un nuevo empalme de ARNm que da como resultado la traducción de proteínas que contienen uno o más dominios peptídicos nuevos a los cuales el sistema inmunitario no ha estado previamente expuesto. En diversas formas de realización, las mutaciones específicas del tumor pueden ser variantes de empalme de ARNm que resultan del suministro o la administración de un modulador de empalme, ADC, o composición que comprende un modulador de empalme o ADC.

[0760] Sin limitarse a ninguna teoría, en diversas formas de realización, el suministro de moduladores de empalme, solos y como parte de un ADC o composición, puede inducir un nuevo empalme de ARNm (por ejemplo, omisión de exón, retención de intrones) que da por resultado la alteración de los marcos de lectura abiertos y/o secuencias codificantes de diversos genes. En diversas formas de realización, estos genes alterados se traducen en proteínas que contienen uno o más dominios peptídicos nuevos reconocidos por el sistema inmune como extraños. En diversas formas de realización, el uno o más nuevos dominios peptídicos no existen en las proteínas ni en ninguna otra parte del proteoma humano en ausencia de tratamiento con un modulador de empalme. En diversas formas de realización, las proteínas que contienen el uno o más dominios peptídicos nuevos pueden ser degradados por el proteasoma para crear nuevos fragmentos peptídicos que actúan como sustratos para la maquinaria de presentación de inmunopéptidos, por ejemplo, a través de la presentación de MHC. En diversas formas de realización, los nuevos fragmentos peptídicos que representan neoantígenos pueden presentarse en el peptidoma unido a MHC1, por ejemplo, en células tumorales.

[0761] En diversas formas de realización, el suministro de moduladores de empalme, solos y como parte de un ADC o composición, puede llevar a uno o más eventos intrínsecos de células tumorales (por ejemplo, detención del crecimiento celular). En diversas formas de realización, los eventos intrínsecos de células tumorales pueden conducir a (1) un aumento del compromiso de las células fagocíticas (Bracci *et al.* (2014) Cell Death Differ. 21(1):15–25); (2) el transporte de nuevos fragmentos peptídicos a un tumor que drena un ganglio linfático para interactuar con las células presentadoras de antígeno; (3) células presentadoras de antígeno que procesan nuevos fragmentos peptídicos a partir de una célula tumoral fagocitada y que presentan los fragmentos como neoantígenos a las poblaciones de células T vírgenes en circulación; (4) nuevos fragmentos peptídicos que interactúan con receptores que expresan células T que reconocen los fragmentos como neoantígenos; (5) maduración y activación de las respuestas de células T efectoras (por ejemplo, células T CD4+ y/o CD8+); y/o (6) participación de células T con células tumorales adicionales expuestas al tratamiento con un modulador de empalme y presentación de nuevos fragmentos peptídicos que representan neoantígenos en sus

complejos MHC1 de superficie. En diversas formas de realización, los eventos intrínsecos de células tumorales pueden resultar, directa o indirectamente, en el compromiso de las células T de la función efectora y/o la muerte de las células tumorales presentadoras de neoantígenos.

[0762] Además, sin limitarse a ninguna teoría, en diversas formas de realización, el suministro de moduladores de empalme, solos y como parte de un ADC o composición, puede causar la reexpresión de retrovirus endógenos residentes en el intrón, lo que conduce a una respuesta inmune de ARN de doble cadena.

[0763] Asimismo, sin limitarse a ninguna teoría, en diversas formas de realización, el suministro de moduladores de empalme, solos y como parte de un ADC o composición, puede conducir a la muerte de células inmunogénicas desencadenada por la liberación inducida por el modulador de empalme de neoantígenos derivados mutacionalmente. En diversas formas de realización, el suministro de moduladores de empalme, solos y como parte de un ADC o composición, puede inducir una respuesta inmune de ARN de doble cadena. En diversas formas de realización, la respuesta inmune de ARN de doble cadena puede resultar de la reexpresión de retrovirus endógenos residentes en el intrón. En diversas formas de realización, la respuesta inmune de ARN de doble cadena puede dar como resultado la muerte de células tumorales. En diversas formas de realización, el suministro de moduladores de empalme, solos y como parte de un ADC o composición, puede inducir la muerte de células inmunogénicas. En diversas formas de realización, la muerte de células inmunogénicas puede resultar de la liberación de neoantígenos derivados de mutaciones y/o una respuesta inmune del huésped contra células tumorales.

[0764] Por consiguiente, en diversas formas de realización, se describen métodos de tratamiento que comprenden inducir neoantígenos mediante la administración de uno o más moduladores de empalme y/o ADC y/o composiciones que comprenden un modulador de empalme o ADC, por ejemplo, cualquier modulador de empalme, ADC o composición divulgada en este documento. En diversas formas de realización, el método comprende administrar una dosis reducida del modulador de empalme, ADC o composición de la que se necesitaría sin la inducción de neoantígenos. En algunas formas de realización, el método comprende administrar una o más dosis de inducción iniciales para producir neoantígenos e inducir una respuesta inmune (por ejemplo, conversión de células T vírgenes en células de memoria), seguida de una dosis o frecuencia de administración reducida (es decir, debido al efecto combinado del modulador de empalme, ADC o composición y del direccionamiento inmune de los neoantígenos). En algunas formas de realización, el tratamiento puede comprender una combinación de administración del modulador de empalme, ADC o composición para inducir una

respuesta inmune basada en neoantígenos y al menos una terapia adicional (por ejemplo, una segunda terapia contra el cáncer). Por ejemplo, en algunas formas de realización, el tratamiento puede comprender una combinación de administración del modulador de empalme, ADC o composición para inducir una respuesta inmune basada en neoantígenos y uno o más inhibidores de punto de control. En algunas formas de realización, el tratamiento puede comprender una combinación de administración del modulador de empalme, ADC o composición para inducir una respuesta inmune basada en neoantígenos y una o más citoquinas o análogos de citoquinas. En algunas formas de realización, el tratamiento puede comprender una combinación de administración del modulador de empalme, ADC o composición para inducir una respuesta inmune basada en neoantígenos y una o más vacunas de neoantígenos. En algunas otras formas de realización, el tratamiento puede comprender una combinación de administración del modulador de empalme, ADC o composición para inducir una respuesta inmune basada en neoantígenos y una o más células T modificadas dirigidas al tumor (por ejemplo, CAR–T).

[0765] En algunas formas de realización, los neoantígenos se pueden usar para monitorear la efectividad del tratamiento con un modulador de empalme, ADC o composición. Por ejemplo, después de la administración de un modulador de empalme, ADC o composición, se puede obtener una muestra del paciente (por ejemplo, una biopsia de tumor) y detectar neoantígenos o identificadores de una respuesta inmune o inflamatoria. Se puede proporcionar un tratamiento adicional, por ejemplo, a una dosis reducida, si se detecta un neoantígeno y/o una respuesta inmune.

[0766] En diversas formas de realización, se divulgan métodos de tratamiento que comprenden inducir una respuesta inmune de ARN de doble cadena mediante la administración de uno o más moduladores de empalme y/o ADC y/o composiciones que comprenden un modulador de empalme o ADC, por ejemplo, cualquier modulador de empalme, ADC o composición divulgada aquí.

[0767] En diversas formas de realización, se divulgan métodos de tratamiento que comprenden inducir la muerte de células inmunogénicas mediante la administración de uno o más moduladores de empalme y/o ADC y/o composiciones que comprenden un modulador de empalme o ADC, por ejemplo, cualquier modulador de empalme, ADC o composición divulgada en el presente documento.

[0768] En diversas formas de realización, la administración de un modulador de empalme, ADC o una composición que comprende un modulador de empalme se puede combinar con cualquier terapia antineoplásica conocida. Los ejemplos de las estrategias de activación inmunológica actuales disponibles para el tratamiento oncológico incluyen, entre otras, el tratamiento con moléculas inhibidoras de punto de control inmune (ICI), el

tratamiento con citoquinas o análogos de citoquinas, la vacunación con vacunas asociadas a tumores, y la ingeniería genética de células T dirigidas a tumores (por ejemplo, expansión de linfocitos infiltrantes del tumor o CAR–T). Estas tecnologías se centran predominantemente en mejorar o inducir una respuesta inmune a antígenos tumorales ya existentes (mutaciones o expresión aberrante de proteínas de superficie celular). Una o más de estas estrategias pueden involucrar una o más mutaciones que son capaces de inducir una respuesta de células T antigénicas. Por ejemplo, las respuestas de los pacientes a la inhibición del punto de control pueden correlacionarse con la carga mutacional no sinónima. Además, se pueden usar enfoques de vacunas contra el cáncer que se basan en mutaciones preexistentes y la antigenicidad de estas mutaciones.

[0769] Los moduladores de empalme y/o los ADC que comprenden dichos moduladores pueden inducir cambios de gran alcance en el transcriptoma que ocurren en múltiples linajes. La traducción de estos cambios del ARNm puede producir cambios de proteínas robustos y reproducibles que producen neopéptidos unidos a MHC1 con alta afinidad en múltiples isotipos de HLA. Sin limitarse a ninguna teoría, debido al gran número de cambios en el transcriptoma y el proteoma, el tratamiento con moduladores de empalme y/o ADC puede enriquecer el número de neoantígenos potencialmente reactivos para un mejor compromiso de la respuesta inmune adaptativa.

[0770] Tal como se describe en el presente documento, los términos "modulador de empalme" o "modulador de espliceosoma" se refieren a compuestos que tienen actividad antineoplásica al interactuar con componentes del espliceosoma. En algunas formas de realización, un modulador de empalme altera la velocidad o la forma de empalme en una celda blanco. Los moduladores de empalme que funcionan como agentes inhibidores, por ejemplo, son capaces de disminuir la proliferación celular descontrolada. En particular, en algunas formas de realización, los moduladores de empalme pueden actuar inhibiendo el complejo de espliceosoma SF3b. En algunas formas de realización, se elige un modulador de empalme de uno o más de los moduladores de empalme divulgados en el presente documento. En algunas formas de realización, se usa un modulador de empalme, entregado a una célula y/o administrado a un sujeto como agente independiente. En algunas otras formas de realización, se usa un modulador de empalme, entregado a una célula y/o administrado a un sujeto como parte de un ADC (por ejemplo, un ADC elegido de cualquiera de los ejemplos de ADC divulgados en este documento). En algunas otras formas de realización, se usa un modulador de empalme, entregado a una célula y/o administrado a un sujeto como parte de una composición que comprende múltiples copias del modulador de empalme o múltiples copias de un ADC que lleva el modulador de empalme. Tales composiciones se divulgan en el presente

documento.

[0771] En algunas formas de realización, un modulador de empalme usado, entregado a una célula y/o administrado a un sujeto como parte de un ADC (por ejemplo, un ADC elegido de cualquiera de los ejemplos de ADC divulgados en este documento) proporciona beneficios terapéuticos adicionales sobre un modulador de empalme usado, entregado a una célula y/o administrado a un sujeto como agente independiente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un modulador de empalme utilizado, entregado a una célula y/o administrado a un sujeto como parte de un ADC proporciona el suministro dirigido del modulador de empalme a una célula neoplásica que expresa el antígeno blanco (es decir, el antígeno dirigido por el resto de anticuerpo del ADC). En algunas formas de realización, tal suministro dirigido del modulador de empalme reduce el tratamiento fuera de objetivo y/o la citotoxicidad fuera de objetivo. En algunas formas de realización, dicho suministro dirigido promueve la presentación de neoantígenos selectivos de tumores en células neoplásicas, pero no en células sanas que no expresan el antígeno blanco. En algunas formas de realización, dicho suministro dirigido conduce a, por ejemplo, al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% del empalme alternativo y la inducción de nuevos ARNm y péptidos asociados al MHC que representan neoantígenos en células neoplásicas dirigidas en lugar de células fuera de objetivo. Por lo tanto, sin limitarse a ninguna teoría, en algunas formas de realización, después del cebado y/o la expansión de células T efectoras (por ejemplo, utilizando una vacuna neoantigénica), el sistema inmunitario puede atacar preferentemente a las células neoplásicas presentadoras de neoantígenos en lugar de las células sanas debido a la expresión preferencial de neoantígenos en células tumorales después del tratamiento con un ADC como se divulga en este documento.

Inducción inmune y régimen de tratamiento:

[0772] En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para inducir al menos un neoantígeno poniendo en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un conjugado anticuerpo–fármaco basado en un modulador de empalme (ADC) o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC. En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para inducir una respuesta inmune de ARN de doble cadena poniendo en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un conjugado anticuerpo–fármaco basado en un modulador de empalme (ADC) o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC. En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para inducir la muerte de células inmunogénicas poniendo en contacto una célula neoplásica

con una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un conjugado anticuerpo–fármaco basado en un modulador de empalme (ADC) o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC.

[0773] En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

[0774] En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en un cultivo celular *in vitro*. En algunas formas de realización, la célula neoplásica se obtiene de un sujeto. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en un sujeto. En algunas formas de realización, la célula neoplásica se deriva de una neoplasia maligna hematológica o un tumor sólido. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de una neoplasia maligna de células B, una leucemia, un linfoma y un mieloma. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2–positivo), cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico), cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial uterino seroso), carcinoma de conductos salivales, melanoma, cáncer de colon, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama HER2–positivo, adenocarcinoma gástrico, cáncer de próstata y osteosarcoma.

[0775] En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona un método para inducir al menos un neoantígeno y/o una respuesta de células T en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC. También se proporciona en la presente, en diversas formas de realización, un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC, en donde la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la

composición induce al menos un neoantígeno y/o una respuesta de células T.

[0776] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para inducir una respuesta inmune de ARN de doble cadena en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC. También se proporciona en la presente, en diversas formas de realización, un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC, en donde la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce una respuesta inmune de ARN de doble cadena.

[0777] En incluso otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para inducir la muerte de células inmunogénicas en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC. También se proporciona en la presente, en diversas formas de realización, un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC, en donde la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce la muerte de la célula inmunogénica.

[0778] En algunas formas de realización de los métodos terapéuticos descritos en la presente, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

[0779] En algunas formas de realización, la presente divulgación además proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC, en donde la administración del modulador de empalme, el conjugado

anticuerpo–fármaco o la composición induce la muerte de la célula inmunogénica, en combinación con una o más terapias adicionales que comprenden un segundo agente.

[0780] En algunas formas de realización de los métodos terapéuticos descritos en la presente, la cantidad del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición o segundo agente administrado se reduce debido a la inducción de al menos un neoantígeno y/o una respuesta de células T, en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición o segundo agente. En algunas formas de realización, la cantidad administrada del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición o segundo agente se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición o segundo agente. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición o segundo agente se administra al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% menos frecuentemente, en comparación con un régimen posológico estándar del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición o segundo agente. En algunas formas de realización, la cantidad y/o dosis administrada del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición o segundo agente da por resultado menor toxicidad sistémica y/o mayor tolerancia.

[0781] Tal como se usa en la presente, el término “dosis estándar” o “régimen de dosificación estándar” se refiere a cualquier régimen de dosificación usual o de rutina para un agente terapéutico, por ejemplo, un régimen propuesto por el fabricante, aprobado por las autoridades regulatorias o de otro modo evaluado en sujetos humanos para satisfacer las necesidades del paciente promedio. En algunas formas de realización, el agente terapéutico es un modulador de empalme, un anticuerpo o un conjugado anticuerpo–fármaco con actividad antineoplásica.

[0782] Por ejemplo, un régimen de dosificación estándar para trastuzumab, un anticuerpo anti–HER2 ejemplar divulgado en la presente, puede ser de 8 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 90 minutos (semana 1) seguido por 6 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 30–90 minutos cada 3 semanas (semana 4 hasta el final del ciclo de tratamiento) (Herceptin® (trastuzumab) FDA Label Supplement, 2017).

[0783] Como otro ejemplo, un régimen de dosificación estándar para ipilimumab, un anticuerpo inhibidor de punto de control anti–CTLA4 ejemplar, puede ser de 3 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas por 4 dosis (Yervoy® (ipilimumab) FDA Label Supplement, 2018). Otro régimen de dosificación

estándar para ipilimumab puede ser de 10 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas por 4 dosis, seguido por 10 mg/kg cada 12 semanas por hasta 3 años (Yervoy® (ipilimumab) FDA Label Supplement, 2018).

[0784] Como otro ejemplo, un régimen de dosificación estándar para nivolumab, un anticuerpo inhibidor de punto de control anti–PD1 ejemplar, puede ser de 3 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 60 minutos cada 2 semanas (Opdivo® (nivolumab) FDA Label, 2015).

[0785] Como otro ejemplo, un régimen de dosificación estándar para atezolizumab, un anticuerpo inhibidor de punto de control anti–PDL1 ejemplar, puede ser de 1200 mg administrados por vía intravenosa durante 60 minutos cada 3 semanas (Tecentriq® (atezolizumab) FDA Label Supplement, 2018).

[0786] Como incluso otro ejemplo, un régimen de dosificación estándar para T–DM1, un conjugado anticuerpo–fármaco anti–HER2 ejemplar, puede ser de 3.6 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas (Kadcila® (T–DM1) FDA Label Supplement, 2016).

[0787] En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente pueden comprender además la administración de al menos una terapia adicional (por ejemplo, un inhibidor de punto de control, una vacuna de neoantígeno, una citoquina o análogo de citoquina, CAR–T, etc.). En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional administrada se reduce debido a la inducción de al menos un neoantígeno y/o una respuesta de células T, en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional administrada se reduce debido a la inducción de una respuesta inmune de ARN de doble cadena, en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional administrada se reduce debido a la inducción de muerte de células inmunogénicas, en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la cantidad administrada del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosis estándar del

modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional se administra al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% menos frecuentemente, en comparación con un régimen posológico estándar del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la cantidad y/o dosis administrada del modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco, composición y/o la al menos una terapia adicional da por resultado menor toxicidad sistémica y/o mayor tolerancia.

[0788] En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se inicia antes de la administración de la al menos una terapia adicional. En otras formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se inicia después de la administración de la al menos una terapia adicional. En incluso otras formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se inicia concurrentemente con la administración de la al menos una terapia adicional.

[0789] En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se repite al menos una vez después de la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición usada para administración repetida se reduce en comparación con la cantidad usada para la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición usada para administración repetida se reduce en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición usada para administración repetida se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosificación estándar o dosificación inicial del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición.

[0790] En algunas formas de realización, la administración de la al menos una terapia adicional se repite al menos una vez después de la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad de la al menos una terapia adicional usada para administración repetida se reduce en comparación con la cantidad usada para la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad de la al menos una terapia adicional usada para administración repetida se reduce en comparación con una

dosis estándar de la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la cantidad de la al menos una terapia adicional usada para administración repetida se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosificación estándar o dosificación inicial de la al menos una terapia adicional.

[0791] En algunas formas de realización, la administración repetida del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición es concurrente con la administración repetida de la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición es secuencial o escalonada con la administración repetida de la al menos una terapia adicional.

[0792] En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende administrar un inhibidor de punto de control, por ejemplo, cualquier inhibidor de punto de control divulgado en la presente. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al inhibidor de punto de control cuando se administra solo. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige a PD1/PDL1, CTLA4, OX40, CD40, LAG3, TIM3, GITR y/o KIR. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige a CTLA4, OX40, CD40 y/o GITR. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control es un anticuerpo que tiene actividad inhibitoria o agonista en su blanco. En algunas formas de realización, un inhibidor de punto de control se dirige con un anticuerpo inhibitorio u otra molécula inhibitoria similar. En otras formas de realización, un inhibidor de punto de control se dirige con un anticuerpo agonista u otra molécula agonista similar.

[0793] En algunas otras formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende administrar una vacuna de neoantígeno, por ejemplo, cualquier vacuna de neoantígeno divulgada en la presente. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición se administra antes de la administración de la vacuna de neoantígeno. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición se administra después de la administración de la vacuna de neoantígeno. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición se administra concurrentemente con la administración de la vacuna de neoantígeno. En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, ADC o composición se repite al menos una vez después de la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, ADC o composición usada para administración repetida se reduce en comparación con la cantidad usada para la administración inicial.

[0794] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al

menos un péptido neoantígeno. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno comprende una o más de una secuencia de neoantígenos.

[0795] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

[0796] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o una porción antigénica de SEQ ID NO: 66. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica no se superpone exclusivamente o consiste en la secuencia peptídica canónica (por ejemplo, cualquiera de las secuencias peptídicas canónicas ejemplares subrayadas en la Tabla 21).

[0797] El término “porción antigénica” o “fragmento antigénico” de una secuencia de neoantígenos, tal como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de una secuencia de neoantígenos que conservan la capacidad para inducir una respuesta de células T (por ejemplo, expansión específica de antígeno y/o maduración de poblaciones

de células T efectoras). Una porción antigénica, en algunas formas de realización, también puede conservar la capacidad para ser internalizada, procesada y/o presentada por células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas). En algunas formas de realización, una porción antigénica también conserva la función de cebado de células T. En algunas formas de realización, una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos (por ejemplo, una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93), o su ARNm codificante, se formula como una vacuna de neoantígeno.

[0798] Una forma de realización ejemplar de una porción antigénica es la región que flanquea los aminoácidos 45–53 de SEQ ID NO: 66. Otra forma de realización ejemplar de una porción antigénica es la región que flanquea los aminoácidos 82–90 de SEQ ID NO: 66. En algunas formas de realización, la porción antigénica es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en un sujeto (por ejemplo, HLA–A*02:01). En algunas otras formas de realización, la porción antigénica es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% de los sujetos de una población de sujetos que sufren un trastorno neoplásico. En algunas formas de realización, la porción antigénica es capaz de generar una respuesta de células T contra un tumor presente en al menos 1%, al menos 5% o al menos 10% de una población de sujetos que sufren un trastorno neoplásico.

[0799] En algunas formas de realización, una porción antigénica no se superpone exclusivamente o consiste en una secuencia peptídica canónica. El término “secuencia peptídica canónica”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier secuencia peptídica contigua presente en el proteoma humano en ausencia de contacto con un modulador de empalme (por ejemplo, en ausencia de contacto con un modulador de empalme solo y/o como parte de un ADC o composición), y/o a la cual el sistema inmune ha estado expuesto previamente. En algunas formas de realización, la secuencia peptídica canónica se deriva y/o es codificada por el marco de lectura abierto del transcripto canónico. Las secuencias peptídicas canónicas ejemplares están subrayadas en la Tabla 21.

[0800] En algunas formas de realización, cuando un modulador de empalme se administra (por ejemplo, solo y/o como parte de un ADC o composición), una secuencia peptídica canónica puede ser derivada de y/o codificada por los 24 nucleótidos inmediatos en marco 5’ que precede un evento de empalme aberrante inducido por el modulador de empalme. Así, en algunas formas de realización, la secuencia peptídica canónica comprende o consiste en los 8 aminoácidos inmediatamente N–terminales a la secuencia de neoantígenos inducida por el modulador de empalme. En algunas formas de realización, cuando una secuencia de exón 5’ termina con un nucleótido terminal de un codón, la secuencia peptídica canónica termina en el final del exón. En algunas otras formas de realización, cuando una secuencia de exón 5’ termina con uno o dos de los tres nucleótidos de un codón, la secuencia peptídica canónica es derivada de y/o codificada por los 24 nucleótidos que preceden el codón incompleto. En algunas formas de realización, las secuencias de ARNm 3’ del evento de empalme aberrante se pueden traducir en el mismo marco de lectura abierto derivado del exón 5’ hasta alcanzar un codón de detención, tras lo cual puede terminar la traducción. En algunas formas de realización, cuando el evento de empalme aberrante (por ejemplo, salto de exón) da por resultado una conservación del marco de lectura abierto del transcripto canónico, la secuencia C–terminal se puede traducir para otros 24 nucleótidos más, codificando 8 aminoácidos C–terminales. En este contexto, en algunas formas de realización, solo la región enfrente de la unión de exón aberrante puede codificar una secuencia de neoantígenos. En algunas formas de realización, cuando el marco de lectura abierto se modifica (por ejemplo, retención de intrón), la secuencia C–terminal completa (codificada por el ARNm 3’) puede codificar una secuencia de neoantígenos.

[0801] En algunas formas de realización, una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos se elige comparando la secuencia de neoantígenos con la secuencia peptídica canónica; y seleccionando una porción de la secuencia de neoantígenos que no se superpone exclusivamente, consiste en y/o se alinea con la secuencia peptídica canónica. Se puede seleccionar una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos, en algunas formas de realización, en cuanto a su antigenicidad y/o función de cebado de células T de la misma manera que las secuencias de neoantígenos de longitud completa (por ejemplo, la secuencia de neoantígenos a partir de la cual se deriva la porción antigénica). En algunas formas de realización, una porción antigénica de una secuencia de neoantígenos es evaluada en cuanto a su antigenicidad y/o función de cebado de células T usando un ensayo de cebado de células T, tal como los experimentos de cebado de células T ejemplares descritos en la presente.

[0802] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una

secuencia de neoantígenos específica para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno personalizada para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos usada para crear una vacuna de neoantígeno personalizada para un sujeto es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en el sujeto. En algunas formas de realización, una vacuna de neoantígeno personalizada se selecciona identificando neoantígenos expresados en el tumor de un sujeto, por ejemplo, después de la administración de un modulador de empalme o ADC, y seleccionando una vacuna que comprende una secuencia de neoantígenos observada en el tumor del paciente, por ejemplo, una vacuna que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65 que se observa en el tumor.

[0803] El término “personalizada”, cuando se usa para describir una vacuna de neoantígeno, se refiere a una vacuna creada identificando uno o más neoantígenos producidos en un paciente, preferiblemente uno identificado en el paciente luego de la exposición a un modulador de empalme, ADC o composición, y usando luego uno o más de esos neoantígenos como base de la vacuna para el mismo paciente. Por consiguiente, en algunas formas de realización, se administra a un paciente un modulador de empalme, ADC o composición, y se estudia en busca de neoantígenos producidos por el tratamiento. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno seleccionada comprende un péptido o ARNm de neoantígeno divulgado en la presente y confirmado como presente en el paciente luego de la exposición al modulador de empalme, ADC o composición. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición y/o vacuna de péptido o ARNm se puede administrar al paciente una vez o en forma repetida. Posteriormente, en algunas formas de realización, uno o más de esos neoantígenos se usan para crear una vacuna personalizada que se administra al paciente. En algunas formas de realización, el uno o más neoantígenos usados para crear una vacuna personalizada poseen afinidad de unión por uno o más alelos HLA específicos del paciente. En algunas formas de realización, el paciente expresa uno o más alelos MHC1 que se unen al uno o más neoantígenos. La predicción de si un neoantígeno dado se unirá a un alelo MHC1 específico se puede determinar usando cualquier método de predicción computacional conocido en el arte. Los ejemplos de métodos de predicción computacional se divulgan, por ejemplo, en Meydan *et al.* (2013) BMC Bioinformatics 14 (Suppl. 2):S13, que se incorpora a la presente por referencia para tales métodos.

[0804] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una secuencia de neoantígenos universal. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno universal.

[0805] El término “universal”, cuando se usa para describir una vacuna de

neoantígeno, se refiere a una vacuna que tiene una secuencia de péptido o ARNm que se basa en neoantígenos comunes o conocidos observados por secuenciación de neoantígenos producidos en múltiples pacientes y/o muestras de tejidos de pacientes, preferiblemente luego de la exposición a un modulador de empalme, ADC o composición. La secuencia de péptido o ARNm usada en la vacuna no necesita estar presente en cada paciente sino observarse en al menos varios pacientes o muestras de tejidos de pacientes. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición y/o vacuna de péptido o ARNm se puede administrar al paciente una vez o repetidas veces. Posteriormente, en algunas formas de realización, esa secuencia de péptido o ARNm se usa para vacunar a otros pacientes. En algunas formas de realización, un paciente recibe un modulador de empalme, ADC o composición, y luego una vacuna de péptido o ARNm de un neoantígeno conocido para potenciar la respuesta inmune a los neoantígenos producidos por el modulador de empalme, ADC o composición. En algunas formas de realización, un paciente recibe una vacuna de péptido o ARNm universal y luego un modulador de empalme, ADC o composición una vez o repetidas veces. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos (o secuencias) usadas para crear una vacuna de neoantígeno universal se selecciona sobre la base de la frecuencia general de alelo MHC1 en una población de pacientes dada (Maiers *et al.* (2007) Hum. Immunol. 68(9):779–88).

[0806] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígeno (por ejemplo, un neoantígeno universal) es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% de los sujetos de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de generar una respuesta de células T contra un tumor presente en al menos 1%, al menos 5% o al menos 10% de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico.

[0807] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos ha sido identificada secuenciando al menos un péptido neoantígeno, o su ARNm codificante, inducido en el sujeto administrando una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno comprende una secuencia de neoantígenos inducida al poner en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en un cultivo celular *in vitro*. En algunas formas de realización, la célula neoplásica se obtiene del sujeto. En algunas formas de

realización, la célula neoplásica está presente en el sujeto.

[0808] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno y un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, cualquiera de los portadores ejemplares descritos en la presente). En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno está unido al portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona de un péptido, una albúmina sérica, una hemocianina de lapa californiana, una inmunoglobulina, una tiroglobulina, una ovalbúmina, un toxoide o un derivado de toxoide atenuado, una citoquina, y una quimioquina. En algunas formas de realización, el péptido neoantígeno y el portador farmacéuticamente aceptable están unidos covalentemente a través de un enlazador. En algunas formas de realización, el péptido neoantígeno y el portador farmacéuticamente aceptable se expresan como una proteína de fusión. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0809] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno. En algunas formas de realización, el al menos un ARNm de neoantígeno codifica una o más de una secuencia de neoantígenos. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

[0810] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o una porción antigénica de SEQ ID NO: 66. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas

formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica no se superpone exclusivamente o consiste en la secuencia peptídica canónica (por ejemplo, cualquiera de las secuencias peptídicas canónicas ejemplares subrayadas en la Tabla 21).

[0811] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una secuencia de neoantígenos específica para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno personalizada para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en el sujeto.

[0812] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una secuencia de neoantígenos universal. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno universal. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% de los sujetos de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de generar una respuesta de células T contra un tumor presente en al menos 1%, al menos 5% o al menos 10% de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico.

[0813] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos ha sido identificada secuenciando la secuencia de proteína de al menos un neoantígeno. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos ha sido identificada secuenciando al menos un ARNm que codifica un neoantígeno inducido en el sujeto administrando una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el al menos un ARNm de neoantígeno codifica una secuencia de neoantígenos inducida al poner en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en un cultivo celular *in vitro*. En algunas formas de realización, la célula neoplásica se obtiene del sujeto. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en el sujeto.

[0814] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno y un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, cualquiera de los portadores ejemplares descritos en la presente). En algunas formas de realización, el al menos un ARNm de neoantígeno está unido al portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona de un péptido, una albúmina sérica, una hemocianina de lapa californiana, una inmunoglobulina, una tiroglobulina, una ovalbúmina, un toxoide o un derivado de toxoide atenuado, una citoquina, y una quimioquina. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el ARNm de neoantígeno está encapsulado por un agente encapsulante. En algunas formas de realización, el agente encapsulante es un liposoma. En algunas formas de realización, el agente encapsulante es una nanopartícula.

[0815] En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende administrar una citoquina o análogo de citoquina, por ejemplo, cualquier citoquina o análogo de citoquina divulgado en la presente. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco a la citoquina o análogo de citoquina cuando se administra sola. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende un potenciador de células T. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IL–2, IL–10, IL–12, IL–15, IFNγ y/o TNFα. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IL–2, IL–10, IL–12 y/o IL–15. En algunas formas de realización, la administración de la citoquina o análogo de citoquina potencia el cebado de células T luego de la administración de un modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco o composición debido a la inducción y presentación de neoantígenos.

[0816] En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende administrar células T dirigidas al tumor modificadas por ingeniería genética (es decir, CAR–T), por ejemplo, cualquier terapia CAR–T divulgada en la presente.

[0817] En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente pueden comprender además detectar uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T en el sujeto después de la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición, y, opcionalmente, continuar la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición si se detecta uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T. En

algunas formas de realización, detectar uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T en el sujeto indica la eficacia del tratamiento con el modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el tratamiento con la terapia adicional, junto con el modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco o composición, se continúa si se detecta uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T. En algunas formas de realización, el tratamiento se continúa en una dosis y/o frecuencia reducida si se detecta uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T.

[0818] En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente pueden comprender además detectar una respuesta inmune de ARN de doble cadena en el sujeto después de la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición, y, opcionalmente, continuar la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición si se detecta una respuesta inmune de ARN de doble cadena. En algunas formas de realización, la detección de una respuesta inmune de ARN de doble cadena en el sujeto indica la eficacia del tratamiento con el modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el tratamiento con la terapia adicional, junto con el modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco o composición, se continúa si se detecta una respuesta inmune de ARN de doble cadena. En algunas formas de realización, el tratamiento se continúa en una dosis y/o frecuencia reducida si se detecta una respuesta inmune de ARN de doble cadena.

[0819] En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente pueden comprender además detectar la muerte de células inmunogénicas en el sujeto después de la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición, y, opcionalmente, continuar la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición si se detecta la muerte de células inmunogénicas. En algunas formas de realización, la detección de la muerte de células inmunogénicas en el sujeto indica la eficacia del tratamiento con el modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el tratamiento con la terapia adicional, junto con modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco o composición, se continúa si se detecta la muerte de células inmunogénicas. En algunas formas de realización, el tratamiento se continúa en una dosis y/o frecuencia reducida si se detecta la muerte de células inmunogénicas.

[0820] En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 150 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 100

mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 50 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico, por ejemplo, una neoplasia maligna hematológica o un tumor sólido. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de una neoplasia maligna de células B, una leucemia, un linfoma y un mieloma. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de útero, carcinoma de conductos salivales, melanoma, cáncer de colon, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama HER2–positivo, adenocarcinoma gástrico, cáncer de próstata y osteosarcoma.

[0821] En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico, que comprende: (a) administrar al sujeto una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o composición que comprende un modulador de empalme o ADC, en donde la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición induce al menos un neoantígeno y/o una respuesta de células T; (b) detectar uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T en el sujeto después de la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición; y (c) continuar la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición si se detecta uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T. En algunas formas de realización, detectar uno o más neoantígenos y/o una respuesta de células T en el sujeto indica la eficacia del tratamiento con el modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el uno o más neoantígenos comprenden una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, el uno o más neoantígenos comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, el uno o más neoantígenos comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, el uno o más neoantígenos comprenden una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

Combinación de modulador de empalme / ADC e inhibición de punto de control inmune:

[0822] En diversas formas de realización, un paciente que tiene un cáncer como se

describe en el presente documento puede tratarse con una combinación de un modulador de empalme, ADC o composición y una terapia con un inhibidor de punto de control. Los puntos de control inmune son vías inhibitorias que desaceleran o detienen las reacciones inmunitarias y evitan el daño excesivo a los tejidos debido a la actividad descontrolada de las células inmunitarias. Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de punto de control" se refiere a cualquier agente terapéutico, incluido cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o cualquiera de sus fragmentos, que inhibe una o más de las vías inhibitorias, permitiendo así una actividad inmune más extensa.

[0823] Se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con inhibición de puntos de control inmune tiene una eficacia robusta en ciertas indicaciones clínicas. Recientemente, la FDA aprobó el uso de un inhibidor de punto de control en pacientes con tumores que muestran una alta inestabilidad de microsatélites, agnóstica al linaje tisular. Esta aprobación se basó, en parte, en la observación de que las tasas de respuesta se correlacionan positivamente con la carga mutacional (Rizvi *et al.* (2015) Science 348(6230):124–8; Hellmann *et al.* (2018) Cancer Cell 33(5):853–861). Las estimaciones de la literatura varían en números absolutos y por linaje, pero en general admiten que por encima de un umbral de ~150–250 mutaciones, la probabilidad de respuesta aumenta. El análisis de los datos de TCGA muestra que un gran porcentaje de linajes de tumores de inicio en adultos tienen una carga mutacional no sinónima comparativamente baja (Vogelstein *et al.* (2013) Science 339:1549–58). La mayoría de los linajes tienen medianas de tasas mutacionales no sinónimas de ~30–80 por paciente, muy por debajo de los umbrales para mejores probabilidades de respuesta a los inhibidores del punto de control.

[0824] Por ejemplo, se ha demostrado que el cáncer de mama HER2 positivo tiene una mediana de ~60 mutaciones no sinónimas por muestra de paciente. Sin embargo, se estima que el umbral para la eficacia del tratamiento con inhibidores de punto de control, como se mencionó anteriormente, se encuentra en el rango de ~150–250 mutaciones no sinónimas, es decir, es más probable que los pacientes por encima de este umbral muestren remisión completa, remisión parcial y/o enfermedad estable, mientras que los pacientes por debajo de este umbral tienen más probabilidades de presentar enfermedad progresiva. Las estrategias para mejorar el número aparente de mutaciones no sinónimas y/o neoantígenos que se presentan en las células tumorales son, por lo tanto, deseables, y pueden aumentar la probabilidad general de respuesta, por ejemplo, a terapias con inhibidores de punto de control. Como las citoquinas (y sus análogos) actúan a través de un mecanismo de acción similar, estas estrategias también pueden aumentar la probabilidad general de respuesta a terapias basadas en citoquinas.

[0825] Las tasas de respuesta actuales en el cáncer de mama HER2 positivo son de ~15–25% (CTI NCT02129556). En diversas formas de realización divulgadas en el presente documento, el tratamiento con un modulador de empalme, ADC o composición en combinación con un inhibidor de punto de control y/o una terapia con citoquinas puede mejorar tales tasas de respuesta. En diversas formas de realización, el tratamiento con un modulador de empalme, ADC o composición en combinación con un inhibidor de punto de control y/o una terapia con citoquinas puede aplicarse a cualquier tumor de aparición en adultos, particularmente en aquellos en los que la mediana de la tasa de mutaciones no sinónimas es inferior al umbral estimado de ~150 mutaciones. En diversas formas de realización, los tipos de cáncer ejemplares adecuados para el tratamiento con un modulador de empalme, ADC o composición de la presente divulgación, solos o en combinación con una terapia adicional (por ejemplo, una terapia con inhibidores de punto de control, una terapia con citoquinas) incluyen, entre otros, cáncer de esófago, linfoma no Hodgkin, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de endometrio, adenocarcinoma pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, glioblastoma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2–positivo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), leucemia linfocítica crónica y leucemia mieloide aguda. Otros tipos de cáncer adecuados ejemplares se identifican, por ejemplo, en Vogelstein *et al.* (2013) Science 339:1549–58, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

[0826] Como muchas terapias con inhibidores de punto de control se basan en la expresión crónica de antígenos asociados a tumores, se requieren refuerzos regulares del tratamiento para mejorar la eficacia y para "re–estimular" las poblaciones de células T reactivas. La naturaleza inducible del modulador de empalme o de los neoantígenos derivados de ADC descritos aquí proporciona regímenes de dosificación terapéutica que pueden diseñarse para potenciar la respuesta inmune de las células T reactivas a neoantígenos, mientras que limita el agotamiento de las células T a menudo causado por la estimulación crónica de antígenos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se administra una dosis inicial de un modulador de empalme, ADC o composición a un sujeto para desencadenar un empalme aberrante y la producción de péptidos neoantígenos. Después de un período de tiempo para permitir la producción de proteínas y la presentación de antígenos, en algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis inicial de un inhibidor de punto de control para aumentar y/o mejorar el cebado y la expansión de células T efectoras. En algunas formas de realización, el período de espera entre las dosis de modulador de empalme, ADC o composición y el inhibidor de punto de control es de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4,

aproximadamente 5, aproximadamente 6 o aproximadamente 7 días. En algunas formas de realización, el período de espera es de entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 5 días. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control está dirigido a CTLA4, OX40, CD40 y/o GITR. En algunas formas de realización, el beneficio terapéutico combinado de un modulador de empalme, ADC o composición y un inhibidor de punto de control puede ser aditivo o superaditivo.

[0827] En algunas formas de realización, después de un período para permitir el cebado y la expansión de células T, al sujeto se le administra una segunda dosis o una dosis posterior del modulador de empalme, ADC o composición para desencadenar la re–presentación de péptidos neoantígenos. En algunas formas de realización, el período de espera entre una dosis inicial de un inhibidor de punto de control y una segunda dosis o una dosis posterior de un modulador de empalme, ADC o composición es de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas. En algunas formas de realización, el período de espera es de aproximadamente 3 semanas. Después de una segunda dosis o una dosis posterior del modulador de empalme, ADC o composición, en algunas formas de realización, el sistema inmune puede participar con las células tumorales presentadoras de neoantígenos y/o provocar la muerte de las células tumorales. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra luego una segunda dosis o una dosis posterior del inhibidor de punto de control para expandir aún más la población de células T efectoras de memoria, después de permitir el cebado y la expansión de células T secundarias.

[0828] En algunas formas de realización, la dosificación del modulador de empalme, ADC o composición luego de este régimen de tratamiento inicial ejemplar puede ser pulsátil, es decir, el modulador de empalme, ADC o composición se pueden administrar a intervalos prolongados (por ejemplo, aproximadamente cada 4 semanas, aproximadamente cada 5 semanas, aproximadamente cada 6 semanas) para permitir la presentación del antígeno, el compromiso de las células T y/o la destrucción de las células tumorales, y/o la recuperación de la población de células T de memoria. En puntos temporales posteriores, en algunas formas de realización, el tratamiento con el modulador de empalme, ADC o composición puede combinarse con uno o más inhibidores de punto de control dirigidos a restaurar la funcionalidad efectora a poblaciones de células T agotadas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, en puntos temporales posteriores, el tratamiento con el modulador de empalme, ADC o composición se puede combinar con uno o más inhibidores de punto de control dirigidos a PD1/PDL1, LAG3 y/o TIM3. En algunas formas de realización, la naturaleza pulsada de la presentación y el cebado de neoantígenos puede permitir que un inhibidor de punto de control y/o un

modulador de empalme, ADC o composición se administren con menos frecuencia y/o en dosis más bajas. En algunas formas de realización, la naturaleza pulsada de la presentación de neoantígenos puede proporcionar uno o más beneficios de tratamiento para un inhibidor de punto de control (por ejemplo, un anticuerpo anti–CTLA4 como ipilimumab), en comparación con el inhibidor de punto de control cuando se administra sin un tratamiento concurrente con un modulador de empalme, ADC o composición, por ejemplo, al disminuir el riesgo potencial de reacciones adversas que a menudo se observan con el régimen de dosificación estándar del inhibidor del punto de control.

[0829] En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control es un inhibidor de la vía del antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4). CTLA4, también conocido como CD152, es un receptor de proteínas que regula a la baja las respuestas inmunitarias. CTLA4 se expresa de forma constitutiva en células T regulatorias, pero solo se regula al alza en células T convencionales después de la activación. Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de CTLA4" se refiere a cualquier inhibidor de CTLA4 y/o la vía de CTLA4. Los inhibidores de CTLA4 ejemplares incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos anti–CTLA4. Los anticuerpos bloqueadores de CTLA4 para usar en humanos se desarrollaron en base a la actividad preclínica observada en modelos de inmunidad antitumoral en ratones. Los ejemplos de anticuerpos anti–CTLA4 incluyen, entre otros, ipilimumab (MDX–010) y tremelimumab (CP–675,206), ambos completamente humanos. Ipilimumab es una IgG1 con una vida media plasmática de aproximadamente 12 a 14 días; tremelimumab es una IgG2 con una vida media plasmática de aproximadamente 22 días. Véase, por ejemplo, Phan *et al.* (2003) Proc Natl Acad Sci USA. 100:8372–7; Ribas *et al.* (2005) J Clin Oncol. 23:8968–77; Weber *et al.* (2008) J Clin Oncol. 26:5950–6. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CTLA4 es ipilimumab.

[0830] En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control es un inhibidor de la vía de muerte programada 1 (PD1). La vía de muerte celular programada 1 (PD1) representa un importante interruptor de control inmunitario que puede ser activado por las células tumorales para superar la vigilancia inmune de las células T activas. Los ligandos para PD1 (PDL1 y PDL2) se expresan de forma constitutiva o pueden inducirse en diversos tumores. Se ha descubierto que la alta expresión de PDL1 en células tumorales (y en menor medida de PDL2) se correlaciona con un mal pronóstico y supervivencia en diversos otros tipos de tumores sólidos. Además, se ha sugerido que PD1 regula la expansión de células T específicas de tumores en pacientes con melanoma maligno. Estas observaciones sugieren que la vía de PD1/PDL1 desempeña un papel fundamental en la evasión inmune del tumor y puede considerarse un objetivo atractivo

para la intervención terapéutica. Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de PD1" se refiere a cualquier inhibidor de PD1 y/o la vía de PD1. Los inhibidores de PD1 ejemplares incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti–PD1 y anti–PDL1. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control es un anticuerpo anti–PD1. Los ejemplos de anticuerpos anti–PD1 incluyen, entre otros, nivolumab y pembrolizumab (MK–3475). Nivolumab, por ejemplo, es un anticuerpo inhibidor del punto de control inmune de PD1 de inmunoglobulina G4 (IgG4) completamente humano que interrumpe la interacción del receptor de PD1 con sus ligandos PDL1 y PDL2, inhibiendo así la respuesta inmune celular (Guo *et al.* (2017) J Cancer 8(3):410–6). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–PD1 es nivolumab. Pembrolizumab, por ejemplo, es un potente mAb humanizado altamente selectivo del isotipo IgG4/kappa diseñado para bloquear directamente la interacción entre PD1 y sus ligandos, PDL1 y PDL2. Pembrolizumab potencia fuertemente las respuestas inmunitarias de los linfocitos T en células sanguíneas cultivadas de donantes humanos sanos, pacientes con cáncer y primates. También se ha informado que pembrolizumab modula el nivel de interleucina–2 (IL–2), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), interferón gamma (IFNγ) y otras citoquinas. Los ejemplos de anticuerpos anti–PDL1 incluyen, entre otros, atezolizumab, avelumab y durvalumab. Atezolizumab, por ejemplo, es un mAb humanizado IgG1 que se informa que bloquea la interacción de PD1/PDL1, al apuntar a PDL1 expresado en numerosos tipos de células malignas. Este bloqueo de la vía de PD1/PDL1 puede estimular los mecanismos de defensa inmune contra los tumores (Abdin *et al.* (2018) Cancers (Basel) 10(2):32). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–PDL1 es atezolizumab.

[0831] En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control está dirigido a PD1/PDL1, CTLA4, OX40, CD40, LAG3, TIM3, GITR y/o KIR. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control está dirigido a CTLA4, OX40, CD40 y/o GITR. En ciertas formas de realización, un inhibidor de punto de control se dirige a un anticuerpo inhibidor u otra molécula inhibidora similar (por ejemplo, un anticuerpo inhibidor anti–CTLA4 o anti–PD1/PDL1). En ciertas otras formas de realización, un inhibidor de punto de control es apuntado con un agonista para el blanco; los ejemplos de esta clase incluyen los blancos estimulantes OX40, CD40 y/o GITR. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control dirigido a OX40, CD40 y/o GITR es un anticuerpo agonista. Los anticuerpos agonistas dirigidos contra OX40 pueden tener una doble función: inhibir la supresión de células T regulatorias, al tiempo que mejoran las funciones de las células T efectoras. También se ha demostrado que los anticuerpos agonistas anti–GITR hacen que las células T efectoras sean más resistentes a la inhibición inducida por células T reguladoras (Karaki *et al.* (2016) Vaccines (Basel) 4(4):37). Del

mismo modo, los anticuerpos agonistas anti–CD40 demuestran actividad antitumoral dependiente de células T. La activación de CD40 en células dendríticas aumenta la presentación cruzada de antígenos tumorales y, en consecuencia, el número de células T efectoras dirigidas al tumor activadas (Ellmark *et al.* (2015) Oncoimmunol. 4(7):e1011484).

[0832] En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control está dirigido a CTLA4 (por ejemplo, un anticuerpo anti–CTLA4). En ciertas formas de realización, el direccionamiento a CTLA4 facilita el cebado y la activación de células T vírgenes. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control está dirigido a OX40 (por ejemplo, un anticuerpo anti–OX40). En ciertas formas de realización, el direccionamiento a OX40 mejora la expansión de células T efectoras. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control está dirigido a CD40 (por ejemplo, un anticuerpo anti–CD40). En ciertas formas de realización, el direccionamiento a CD40 inhibe el cebado "tolerogénico" de células T y/o la formación de células T regulatorias. En ciertas formas de realización, el inhibidor de punto de control está dirigido a GITR (por ejemplo, un anticuerpo anti–GITR). En ciertas formas de realización, el direccionamiento a GITR inhibe la actividad de las células T regulatorias. En ciertas formas de realización, el beneficio de la terapia de combinación (por ejemplo, el efecto en al menos un síntoma o el riesgo / la tasa de progresión de la enfermedad) con un modulador de empalme, ADC o composición y un agente dirigido a CTLA4, OX40, CD40 y/o GITR es aditivo. En algunas formas de realización, el beneficio de la terapia de combinación con un modulador de empalme, ADC o composición y un agente dirigido a CTLA4, OX40, CD40 y/o GITR es superaditivo (es decir, sinérgico).

[0833] Las estrategias de tratamiento con inhibidores de punto de control se basan en la hipótesis de que el tratamiento facilita y/o mejora el cebado de las respuestas de células T a los tumores débilmente o poco antigénicos (por ejemplo, CTLA4) o que el tratamiento restaura y/o revitaliza las células T que responden a los antígenos tumorales, pero se han "agotado" debido a la naturaleza crónica de la presentación de antígeno (por ejemplo, PD1, PDL1) (Chen y Mellman (2013) Immunity 39(1):1–10). En la técnica se conocen ejemplos de terapias y agentes de inhibición de punto de control adecuados, por ejemplo, anticuerpos anti–PD1, anti–PDL1 o anti–CTLA4. Véase, por ejemplo, WO 2001/014424, WO 2013/173223, WO 2016/007235.

[0834] La combinación de estas respuestas de células T cebadas después de la terapia con inhibidores de punto de control con el tratamiento para inducir neoantígenos en células tumorales a las que puede reaccionar el sistema inmunitario cebado puede proporcionar una sinergia beneficiosa. Como el modulador de empalme o los neoantígenos derivados de ADC aún no se han presentado para el cebado de células T, la

combinación con un inhibidor de CTLA4 puede ser particularmente beneficiosa. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende administrar uno o más moduladores de empalme, ADC o composición para inducir la producción de neoantígenos, seguidos antes, concurrentemente o posteriormente de una administración inicial de un inhibidor de CTLA4 para estimular el cebado de células T CD8. En algunas formas de realización, se proporcionan al paciente administraciones adicionales de un inhibidor de CTLA4, por ejemplo, para estimular adicionalmente el cebado y/o la activación de poblaciones de CD8 reactivas a neoantígenos. En algunas formas de realización, se pueden proporcionar al paciente administraciones adicionales de modulador de empalme, ADC o composición para aumentar la presentación de neoantígenos por parte del tumor. Las administraciones repetidas de la terapia con un modulador de empalme, ADC o composición y el inhibidor de punto de control pueden ocurrir al mismo tiempo o a intervalos escalonados. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende además administrar un cotratamiento con el inhibidor de PD1/PDL1, por ejemplo, para restaurar la función efectora de las células T dirigidas a neoantígenos agotadas en el microambiente tumoral.

[0835] Los términos "combinación" o "terapia de combinación", tal como se usan en este documento, se refieren a la administración de uno o más moduladores de empalme, ADC o composiciones junto con un agente o terapia adicional (por ejemplo, un inhibidor de punto de control, una citoquina o análogo de citoquina, una vacuna de neoantígeno, CAR–T), como parte de un régimen de tratamiento destinado a proporcionar un efecto beneficioso (es decir, aditivo o sinérgico) a partir de la acción conjunta de uno o más de los agentes administrados. En algunas formas de realización, la combinación también puede incluir uno o más agentes adicionales, que incluyen, entre otros, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos y agentes que reducen la inmunosupresión (por ejemplo, un segundo inhibidor de punto de control). El efecto beneficioso de la combinación incluye, entre otros, la acción farmacocinética o farmacodinámica conjunta resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo durante un período de tiempo definido (por ejemplo, minutos, horas, días o semanas, dependiendo de la combinación seleccionada).

[0836] Administrado "en combinación" o "coadministración", tal como se usa en este documento, significa que se administran dos o más tratamientos diferentes a un sujeto durante la aflicción del sujeto con una afección médica (por ejemplo, un trastorno neoplásico). Por ejemplo, en algunas formas de realización, los dos o más tratamientos se administran después de que el sujeto ha recibido el diagnóstico de una enfermedad o trastorno, y antes de que la enfermedad o el trastorno se haya curado o eliminado, o

cuando se identifica que un sujeto está en riesgo pero antes de que el sujeto haya desarrollado síntomas de la enfermedad. En algunas formas de realización, la administración de un tratamiento aún ocurre cuando comienza la administración del segundo tratamiento, de modo que hay una superposición. En algunas formas de realización, el primer y el segundo tratamiento se inician al mismo tiempo. Estos tipos de administración a veces se denominan en este documento "simultáneos", "concurrentes" o "concomitantes". En otras formas de realización, la administración de un tratamiento finaliza antes de que comience la administración del segundo tratamiento. Este tipo de administración a veces se denomina en este documento “sucesiva” o “secuencial”.

[0837] En algunas formas de realización, los dos tratamientos (por ejemplo, un modulador de empalme, ADC o composición y un inhibidor de punto de control) están comprendidos en la misma composición. Dichas composiciones pueden administrarse en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En otras formas de realización, los dos tratamientos (por ejemplo, un modulador de empalme, ADC o composición y un inhibidor de punto de control) se administran en composiciones separadas, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una composición que comprende un modulador de empalme o ADC y una composición que comprende un inhibidor de punto de control se puede administrar de forma concurrente o secuencial, en cualquier orden en diferentes puntos temporales; en cualquier caso, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

[0838] En formas de realización de administración simultánea o secuencial, el tratamiento puede ser más efectivo debido a la administración combinada. En algunas formas de realización, el primer tratamiento es más efectivo, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del primer tratamiento (por ejemplo, con una dosis más baja), que el que se vería si el primer tratamiento se administrara en ausencia del segundo tratamiento. En algunas formas de realización, el primer tratamiento es más efectivo, de modo que la reducción de un síntoma, u otro parámetro asociado con la enfermedad o trastorno, es mayor que lo que se observaría con el primer tratamiento administrado en ausencia del segundo tratamiento. En otras formas de realización, se observa una situación análoga con el segundo tratamiento. En algunas formas de realización, el beneficio de la terapia de combinación (por ejemplo, el efecto sobre al menos un síntoma o el riesgo / la tasa de progresión de la enfermedad) es aditivo. En algunas formas de realización, el beneficio de la terapia de combinación es superaditivo.

[0839] En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico

mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; y al menos una terapia adicional (por ejemplo, una terapia con inhibidor de punto de control, una citoquina o análogo de citoquina, una vacuna de neoantígeno, CAR–T). En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, ADC o composición induce al menos un neoantígeno y/o una respuesta de células T. En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, ADC o composición induce una respuesta inmune de ARN de doble cadena. En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, ADC o composición induce la muerte de la célula inmunogénica. En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional puede comprender al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco terapias adicionales. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un modulador de empalme, ADC o composición se puede administrar en combinación con dos terapias de punto de control, es decir, usando dos inhibidores de punto de control diferentes. En algunas otras formas de realización, un modulador de empalme, ADC o composición se puede administrar en combinación con una terapia de inhibidor de punto de control y una vacuna de neoantígeno.

[0840] En algunas formas de realización de la terapia de combinación, la cantidad administrada del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición y/o la al menos una terapia adicional se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición y/o la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición y/o la al menos una terapia adicional se administra al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% menos frecuentemente, en comparación con un régimen posológico estándar del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición y/o la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la cantidad y/o dosis administrada del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición y/o la al menos una terapia adicional da por resultado menor toxicidad sistémica y/o mayor tolerancia.

[0841] En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se inicia antes de la administración de la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se inicia después de la administración de la al menos una terapia adicional.

En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se inicia concurrentemente con la administración de la al menos una terapia adicional.

[0842] En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición se repite al menos una vez después de la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición usada para administración repetida se reduce en comparación con la cantidad usada para la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición usada para administración repetida se reduce en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición usada para administración repetida se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición.

[0843] En algunas formas de realización, la administración de la al menos una terapia adicional se repite al menos una vez después de la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad de la al menos una terapia adicional usada para administración repetida se reduce en comparación con la cantidad usada para la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad de la al menos una terapia adicional usada para administración repetida se reduce en comparación con una dosis estándar de la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la cantidad de la al menos una terapia adicional usada para administración repetida se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosis estándar de la al menos una terapia adicional.

[0844] En algunas formas de realización, la administración repetida del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición es concurrente con la administración repetida de la al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la administración repetida del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición es secuencial o escalonada con la administración repetida de la al menos una terapia adicional.

[0845] En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC;

y una terapia de inhibidor de punto de control. En algunas formas de realización, la terapia de inhibidor de punto de control comprende administrar al menos un inhibidor de punto de control. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al al menos un inhibidor de punto de control cuando se administra solo. En algunas formas de realización, un sujeto se puede considerar no sensible o poco sensible al al menos un inhibidor de punto de control según se determina usando, por ejemplo, los Criterios de Respuesta de tipo inmune (irRC) y/o los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos de tipo inmune (irRECIST). Véase, por ejemplo, Wolchok *et al.* (2009) Clin Cancer Res. 15(23):7412–20; Bohnsack *et al.* "Adaptation of the Immune–Related Response Criteria:irRECIST" (Abstract 4958) ESMO 2014. Los criterios ilustrativos pueden incluir aquellos usados en el arte para definir cuándo los tumores de los pacientes oncológicos mejoran ("responden"), permanecen sin cambios ("se estabilizan") o empeoran ("progresan") durante el tratamiento, cuando el tratamiento que está siendo evaluado es un fármaco de inmunooncología (por ejemplo, un inhibidor de punto de control). En algunas formas de realización, un sujeto se puede considerar intolerante al por lo menos un inhibidor de punto de control si el sujeto presenta uno o más eventos adversos (de grado 2+) identificados para el respectivo inhibidor de punto de control (por ejemplo, ipilimumab). En algunas formas de realización, por ejemplo, un sujeto se puede considerar intolerante al tratamiento con ipilimumab si el sujeto presenta uno o más eventos adversos seleccionados de enterocolitis, hepatitis, dermatitis (incluyendo necrólisis epidérmica tóxica), neuropatía y endocrinopatía (Yervoy® (ipilimumab) FDA Label Supplement, 2018).

[0846] En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige a PD1/PDL1, CTLA4, OX40, CD40, LAG3, TIM3, GITR y/o KIR. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige a CTLA4, OX40, CD40 y/o GITR. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige con un anticuerpo inhibitorio u otra molécula inhibitoria similar. En algunas otras formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige con un anticuerpo agonista u otra molécula agonista similar. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control comprende un inhibidor de la vía del antígeno 4 asociado con linfocito T citotóxico (CTLA4). En algunas formas de realización, el inhibidor de CTLA4 es un anticuerpo anti–CTLA4. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CTLA4 es ipilimumab. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control comprende un inhibidor de la vía de muerte programada 1 (PD1). En algunas formas de realización, el inhibidor de PD1 es un anticuerpo anti–PD1. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–PD1 es nivolumab. En algunas formas de realización, el inhibidor de PD1 es un anticuerpo anti–

PDL1. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–PDL1 es atezolizumab. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control comprende un inhibidor de CTLA4 y un inhibidor de PD1. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige a OX40. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige a CD40. En algunas formas de realización, el inhibidor de punto de control se dirige a GITR. En algunas formas de realización, el beneficio de la terapia de combinación (por ejemplo, el efecto en al menos un síntoma o el riesgo/ la tasa de progresión de la enfermedad) con un modulador de empalme, ADC o composición y un inhibidor de punto de control (por ejemplo, un anticuerpo o molécula dirigida a CTLA4, PD1/PDL1, OX40, CD40 y/o GITR) es aditivo. En algunas formas de realización, el beneficio de la terapia de combinación con un modulador de empalme, ADC o composición y un inhibidor de punto de control (por ejemplo, un anticuerpo o molécula dirigida a CTLA4, PD1/PDL1, OX40, CD40 y/o GITR) es superaditivo (es decir, sinérgico).

[0847] En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; y una terapia con citoquina o análogo de citoquina. En algunas formas de realización, la terapia con citoquina o análogo de citoquina comprende administrar al menos una citoquina o análogo de citoquina. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco a la al menos una citoquina o análogo de citoquina cuando se administra sola.

[0848] En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende un potenciador de células T. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IL–2, IL–10, IL–12, IL–15, IFNγ y/o TNFα. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IL–2, IL–10, IL–12 y/o IL–15. En algunas formas de realización, la administración de la citoquina o análogo de citoquina potencia el cebado de células T luego de la administración de un modulador de empalme, conjugado anticuerpo–fármaco o composición debido a la inducción y presentación de neoantígenos.

[0849] En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IL–2. En algunas formas de realización, IL–2 potencia las señales a células efectoras que promueven su expansión (Rosenberg (2014) J Immunol. 192(12):5451–8). En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IL–10. En algunas formas de realización, IL–10 potencia el cebado y la activación de células T CD8+ (Mumm *et al.* (2011) Cancer Cell 20(6):781–96). En algunas formas de realización, la

citoquina o análogo de citoquina comprende IL–12. En algunas formas de realización, IL–12 vincula las respuestas inmunes innata y adaptativa para potenciar el cebado y el direccionamiento específico de antígeno (Tugues *et al.* (2015) Cell Death Differ. 22(2):237–46). En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IL–15. En algunas formas de realización, IL–15 potencia el cebado y/o la activación de células T efectoras (CD8). En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende IFNγ. En algunas formas de realización, IFNγ suplementa la secreción de IFNγ de células T efectoras. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina comprende TNFα. En algunas formas de realización, TNFα suplementa la secreción de TNFα de células T efectoras.

[0850] En algunas formas de realización, una dosis inicial de un modulador de empalme, ADC o composición se administra a un sujeto para desencadenar el empalme aberrante y la producción de péptidos de neoantígeno. Luego de un período para permitir la producción de proteína y la presentación de antígeno, en algunas formas de realización, el sujeto recibe entonces una dosis inicial de una citoquina o análogo de citoquina para potenciar y/o mejorar el cebado y la expansión de células T efectoras. En algunas formas de realización, el período de espera entre dosis del modulador de empalme, ADC o composición y la citoquina o análogo de citoquina es de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6 o aproximadamente 7 días. En algunas formas de realización, el período de espera es de entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 5 días. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina es IL–2, IL–10, IL–12, IL–15, IFNγ y/o TNFα. En algunas formas de realización, el beneficio terapéutico combinado de un modulador de empalme, ADC, o composición y una citoquina o análogo de citoquina puede ser aditivo o superaditivo.

[0851] En algunas otras formas de realización, una dosis inicial de una citoquina o análogo de citoquina se administra a un sujeto para potenciar y/o mejorar el cebado y la expansión de células T efectoras. Luego de un período de espera, en algunas formas de realización, el sujeto recibe entonces una dosis inicial de un modulador de empalme, ADC o composición para desencadenar el empalme aberrante y la producción de péptidos de neoantígenos. En algunas formas de realización, el período de espera entre dosis de la citoquina o análogo de citoquina y el modulador de empalme, ADC o composición es de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6 o aproximadamente 7 días. En algunas formas de realización, el período de espera es de entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 5 días. En algunas formas de realización, la citoquina o análogo de citoquina es IL–2, IL–10, IL–12, IL–

15, IFNγ y/o TNFα. En algunas formas de realización, el beneficio terapéutico combinado de una citoquina o análogo de citoquina y un modulador de empalme, ADC o composición puede ser aditivo o superaditivo.

[0852] En algunas formas de realización, luego de un período para permitir el cebado y la expansión de células T, el sujeto recibe entonces una segunda dosis o dosis subsiguiente del modulador de empalme, ADC o composición para desencadenar la re–presentación de péptidos de neoantígenos. En algunas formas de realización, el período de espera entre una dosis inicial de una citoquina o análogo de citoquina y una segunda dosis o dosis subsiguiente de un modulador de empalme, ADC o composición es de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas. En algunas formas de realización, el período de espera es de aproximadamente 3 semanas. En algunas formas de realización, la dosis subsiguiente de la citoquina o análogo de citoquina se puede administrar, por ejemplo, intercalada entre dosis subsiguientes del modulador de empalme, ADC o composición. Luego de una segunda dosis o dosis subsiguiente del modulador de empalme, ADC o composición, en algunas formas de realización, el sistema inmune puede engancharse con las células tumorales presentadoras de neoantígeno y/o generar la destrucción de células tumorales. En algunas formas de realización, la dosificación del modulador de empalme, ADC o composición luego de este régimen de tratamiento inicial ejemplar puede ser pulsátil, es decir, el modulador de empalme, ADC o composición se puede dosificar a intervalos prolongados (por ejemplo, aproximadamente cada 4 semanas, aproximadamente cada 5 semanas, aproximadamente cada 6 semanas) para permitir la presentación de antígenos, el compromiso de células T y/o la destrucción de células tumorales, y/o la recuperación de la población de células T de memoria.

[0853] En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 150 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 100 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 50 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico, por ejemplo, una neoplasia maligna hematológica o un tumor sólido. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de una neoplasia maligna de células B, una leucemia, un linfoma y un mieloma. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de

útero, carcinoma de conductos salivales, melanoma, cáncer de colon, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, y cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama HER2–positivo, adenocarcinoma gástrico, cáncer de próstata y osteosarcoma.

Combinación de modulador de empalme / ADC y vacuna de neoantígeno:

[0854] En diversas formas de realización, un paciente que tiene un cáncer como se describe en el presente documento puede tratarse con una combinación de un modulador de empalme, ADC o composición y una vacuna de neoantígeno. Sin limitarse a ninguna teoría, las vacunas, usadas solas o en combinación con moléculas inhibidoras de punto de control inmune (ICI), se han mostrado promisorias en los primeros ensayos (Ott *et al.* (2017) Nature 547(7662):217–21; Sahin *et al.* (2017) Nature 547(7662):222–6), pero generalmente requieren la secuenciación de mutaciones tumorales del paciente (Ott *et al.* (2017) Nature 547(7662):217–21; Aldous y Dong (2018) Bioorg. Med. Chem. 26(10):2842–9). Como tales, las vacunas a menudo dependen de un número suficiente de mutaciones no sinónimas que son antigénicas. En general, los tumores con una carga mutacional muy baja proporcionan pocos antígenos candidatos, y los que tienen un crecimiento rápido proporcionan un tiempo limitado para identificar y producir vacunas específicas para el paciente.

[0855] Hasta la fecha, los intentos de desarrollar vacunas que serían ampliamente inmunogénicas en un gran porcentaje de pacientes se han centrado en proteínas que están frecuentemente mutadas, sobreexpresadas ectópicamente, o amplificadas, y/o que existen como proteínas "propias" dentro del organismo. Además, estas proteínas a menudo se expresan en tejidos inmunológicamente restringidos (por ejemplo, marcadores neuronales expresados en tipos de tumores neuroendocrinos), mientras que otras pueden expresarse normalmente durante la embriogénesis (por ejemplo, antígenos oncofetales). Por lo tanto, la utilidad de las vacunas que utilizan tales proteínas como antígenos a menudo se limita a linajes o subconjuntos de tumores específicos donde se presentan uno o más de los antígenos. La utilidad de la vacuna también debería confirmarse mediante la secuenciación de las muestras tumorales del paciente, lo que puede llevar mucho tiempo.

[0856] Además, si estos antígenos existen como proteínas "propias", es probable que el sistema inmunitario esté preparado para reconocerlas como "propias" y, por lo tanto, no responda. O, alternativamente, si el sistema inmunitario es capaz de montar una respuesta efectora a estos antígenos, puede provocar efectos secundarios en el blanco en tejidos donde se puede expresar el antígeno. En ambos casos, uno de los desafíos clave es que la mayoría de los péptidos antigénicos se derivan de genes "pasajeros" (es decir,

genes que mutan o se amplifican en el curso de la tumorigénesis, pero que no desempeñan un papel crítico en la supervivencia continua o la proliferación del propio tumor). Como tales, estos genes pueden silenciarse sin consecuencias significativas para la progresión tumoral y, por lo tanto, permitirían a un tumor "escapar" de la respuesta inmunitaria contra estos antígenos. Sin desear limitarse a ninguna teoría, este mecanismo puede desempeñar un papel en la evolución del tumor, donde las mutaciones aleatorias que son fuertemente antigénicas a menudo son "seleccionadas en contra" por el tumor durante las primeras etapas de la tumorigénesis (Dunn *et al.* (2004) Annu. Rev. Immunol. 22:329–60).

[0857] Además, ciertas pruebas también indican que la presentación crónica de antígenos y la estimulación inmune pueden provocar anergia y agotamiento de las células inmunitarias (Pardoll (2012) Nat. Rev. Cancer 12(4):252–64). Estos fenotipos subyacen a la lógica terapéutica detrás de los actuales tratamientos con ICI, ya que se ha demostrado que los ICI reprimen el fenotipo de células inmunitarias agotadas (α–PD1/PD–L1) o facilitan las respuestas de células inmunitarias adicionales (α–CTLA4). En particular, con la terapia con α–CTLA4, se ha informado que cierto subgrupo de pacientes exhiben graves eventos adversos relacionados con el sistema inmunitario que pueden atribuirse a la promoción de la activación de las células T y a una ruptura de los mecanismos de tolerancia inmunológica que restringen las respuestas inmunitarias auto–reactivas.

[0858] Ambos enfoques (es decir, la activación o potenciación de respuestas inmunes *de novo* a neoantígenos o la des–represión de la anergia o el agotamiento de las respuestas inmunes existentes) están vinculados a una activación inmune crónica. Como tales, estos enfoques son sensibles a la anergia, la edición y otros mecanismos mediados por tumores diseñados para suprimir el compromiso inmunológico.

[0859] En contraste, el tratamiento con un modulador de empalme, ADC o composición divulgada en el presente documento puede inducir una respuesta inmune a nuevas secuencias que representan neoantígenos. En algunas formas de realización, la presentación de neoantígenos proporciona al sistema inmune adaptativo objetivos más divergentes con los que se puede comprometer y activar. En algunas formas de realización, la capacidad de un modulador de empalme, ADC o composición para inducir de manera aguda el empalme alternativo y los neoantígenos resultantes puede reducir el riesgo de fatiga del sistema inmunológico debido a la exposición crónica a neoantígenos impulsados por mutaciones y/o limitar la capacidad de las células tumorales para adaptarse a fin de evadir la terapia. En algunas formas de realización, la administración de un modulador de empalme, ADC o composición en combinación con una vacuna de neoantígenos mejora la respuesta inmune a los neoantígenos producidos por el

modulador de empalme, ADC o composición. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición se administran antes, durante o después de la vacunación. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición y/o la vacuna pueden administrarse una o más veces durante el curso del tratamiento. En algunas formas de realización, la vacuna se administra una vez y el modulador de empalme, ADC o composición se administran más de una vez durante el curso del tratamiento. En algunas formas de realización, la vacuna se administra una vez y luego se administran uno o más refuerzos durante el curso del tratamiento.

[0860] Tal como se usa en el presente documento, el término "vacuna de neoantígeno" se refiere a una muestra combinada de uno o más péptidos o ARNm de neoantígenos inmunogénicos, por ejemplo al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más péptidos neoantígenos. El término "vacuna" se refiere a una composición para generar inmunidad para la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, un trastorno neoplásico, por ejemplo, un tumor maligno hematológico o un tumor sólido). Por consiguiente, las vacunas son medicamentos que comprenden agentes inmunogénicos y están destinadas a ser utilizadas en humanos o animales para generar defensas inmunitarias específicas y sustancias protectoras después de la vacunación. Una vacuna de neoantígeno puede incluir adicionalmente un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0861] Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunogénico" se refiere a cualquier agente o composición que puede provocar una respuesta inmune, por ejemplo, una respuesta de células T. La respuesta inmune puede ser mediada por anticuerpos o células, o ambos.

[0862] En algunas formas de realización, a un paciente se le administra un modulador de empalme, ADC o composición y luego se le administra una vacuna de péptido o ARNm de neoantígeno conocido para mejorar la respuesta inmune a los neoantígenos producidos por el modulador de empalme, ADC o composición. En algunas otras formas de realización, a un paciente se le administra un modulador de empalme, ADC o composición y se analiza para detectar los neoantígenos producidos por el tratamiento. Posteriormente, uno o más de esos neoantígenos se utilizan para crear una vacuna personalizada que se administra al paciente. En cualquiera de estas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición y/o la vacuna de péptido o ARNm se pueden administrar al paciente una vez o repetidamente.

[0863] En diversas formas de realización, un neoantígeno adecuado para una vacuna puede identificarse seleccionando un panel de transcriptos con empalme alterado y expresión robusta a partir de una o más muestras de tejido en un paciente (por ejemplo,

de una biopsia tumoral). En algunas formas de realización, las secuencias de proteínas variantes se identifican en la muestra analizada en función de la traducción a través de la unión de ARNm empalmada aberrantemente mientras se retienen porciones de la secuencia de proteína (hasta 12 aminoácidos) que flanquean los cambios de aminoácidos que abarcan la unión. En algunas formas de realización, estos fragmentos peptídicos que se extienden en la unión se estudian para determinar la unión de alta afinidad a los alelos MHC1, por ejemplo, utilizando una herramienta como NetMHC1 (Nielsen *et al.* (2003) Protein Sci 12(5):1007–17; Andreatta y Neilsen (2016) Bioinformatics 32(4):511–7). Estos resultados permiten el filtrado de los neopéptidos a aquellos que se pronostican como aglutinantes de alta afinidad para una composición única de alelos HLA del paciente, así como el ensamblaje de grupos de neopéptidos que se predice que se unen ampliamente a los alelos HLA que están presentes con altas frecuencias en diferentes poblaciones (Maiers *et al.* (2007) Hum Immunol 68(9):779–88). En diversas formas de realización, los neopéptidos identificados se formulan luego como una vacuna, por ejemplo, por conjugación con un vehículo o adyuvante adecuado (Ott *et al.* (2017) Nature 547(7662):217–21), o para la administración como un ARNm (Sahin *et al.* (2017) Nature 547(7662):222–6).

[0864] En algunas formas de realización, el neoantígeno seleccionado se basa en una selección de la respuesta tumoral de un paciente individual al modulador de empalme, ADC o composición para identificar uno o más neoantígenos resultantes del tratamiento para usar en la vacunación posterior. En otras formas de realización, se elige un neoantígeno, por ejemplo, basado en la selección de un panel de muestras de diferentes pacientes para identificar neoantígenos comunes producidos por el modulador de empalme, ADC o composición y luego se usa como una vacuna universal para futuros pacientes.

[0865] Sin limitarse a ninguna teoría, en algunas formas de realización, el uso de una vacuna de neoantígeno universal evitaría la necesidad de secuenciar y analizar el estado mutacional único del tumor de cada paciente, ya que los neoantígenos elegidos no dependen de la mutación del tumor sino que imitan a un neoantígeno producido por un modulador de empalme, ADC o composición y generalmente son reconocidos por el cuerpo como extraños. Además, en algunas formas de realización, el uso de una vacuna neoantigénica puede ser particularmente eficaz ya que las células tumorales del paciente pueden ser más propensas a mutar y no producir uno o más neoantígenos que dependen de la mutación tumoral, en comparación con las que imitan un neoantígeno producido por un modulador de empalme, ADC o composición. Esto puede permitir la formulación de una vacuna a granel que sería ampliamente inmunogénica en un gran porcentaje de

pacientes, acelerando el inicio de un régimen de tratamiento. Los pacientes pueden vacunarse de acuerdo con los esquemas descritos en este documento y, antes de completar la vacunación, pueden tratarse adicionalmente con un modulador de empalme, ADC o composición, por ejemplo, para inducir la expresión de los péptidos neoantígenos. En algunas formas de realización, a los pacientes se les puede administrar un modulador de empalme, ADC o composición antes, al mismo tiempo o después de la vacunación. En algunas formas de realización, a los pacientes se les administra un modulador de empalme, ADC o composición, se analizan para detectar uno o más neoantígenos encontrados en un panel de neoantígenos universales, y se vacunan con una vacuna de neoantígeno universal que comprende al menos un neoantígeno universal identificado en el sujeto. En algunas formas de realización, a los pacientes se les puede administrar un modulador de empalme, ADC o composición una o más de una vez después de la vacunación. El modulador de empalme o ADC o composición y/o la vacuna se pueden administrar una o más veces durante el curso del tratamiento.

[0866] En diversas formas de realización, una vacuna puede comprender uno o más de un péptido neoantígeno o ARNm. En diversas formas de realización, una vacuna puede comprender uno o más de un péptido neoantígeno largo. Tales péptidos neoantígenos "largos", en diversas formas de realización, experimentan una internalización, procesamiento y presentación cruzada eficientes en células presentadoras de antígenos profesionales, tales como células dendríticas. De manera similar, en otros contextos, se ha demostrado que los péptidos vacunales largos inducen células T citotóxicas en humanos (Melief y van der Burg (2008) Nat Rev Cancer 8(5):351–60). En diversas formas de realización, un péptido neoantígeno se extiende para comprender la propia secuencia del péptido neoantígeno además de las secuencias de aminoácidos flanqueantes. En diversas formas de realización, la secuencia peptídica extendida facilita la captación de proteína por las células presentadoras de antígeno, por ejemplo, células dendríticas. En diversas formas de realización, la secuencia peptídica extendida permite la presentación eficaz de antígenos y el cebado de células T en modelos con diferentes isotipos de HLA. En diversas formas de realización, un péptido neoantígeno más largo y/o una secuencia peptídica extendida exhiben una mayor captación por las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas), una mayor presentación de antígeno y/o un cebado de células T mayor, en comparación con un péptido neoantígeno más corto y/o una secuencia peptídica más corta (por ejemplo, una secuencia peptídica de menos de aproximadamente 10 o menos de aproximadamente 5 aminoácidos de longitud). En algunas formas de realización, un péptido neoantígeno largo varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas

de realización, un péptido neoantígeno largo varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, un péptido neoantígeno largo varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, un péptido neoantígeno largo varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. Las secuencias de aminoácidos de péptidos neoantígenos largos ejemplares se exponen en la Tabla 21.

[0867] Tal como se usa en este documento, una vacuna de péptido neoantígeno o ARNm abarca el uso de un fragmento de un péptido neoantígeno o su ARNm codificante, siempre que ese fragmento retenga un potencial inmunogénico.

[0868] En algunas formas de realización, una vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno. En algunas formas de realización, una vacuna de neoantígeno comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 15 o al menos 20 péptidos de neoantígenos. En algunas formas de realización, los péptidos neoantígenos oscilan de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, los péptidos neoantígenos oscilan de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, los péptidos neoantígenos oscilan de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, los péptidos neoantígenos oscilan de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud.

[0869] En diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; y una vacuna de neoantígeno. Una vacuna de neoantígeno puede ser, por ejemplo, un péptido o vacuna de neoantígeno de ARNm. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición se administra antes de la administración de la vacuna de neoantígeno. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición se administra después de la administración de la vacuna de neoantígeno. En algunas formas de realización, el modulador de empalme, ADC o composición se administra concurrentemente con la administración de la vacuna de neoantígeno. En algunas formas de realización, la administración del modulador de empalme, ADC o composición se repite al menos una vez después de la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, ADC o composición usada para administración repetida se reduce en comparación con la

cantidad usada para la administración inicial.

[0870] En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona una combinación que comprende un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; y una vacuna de neoantígeno (por ejemplo, una vacuna de neoantígeno universal) para usar en el tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno es un péptido o vacuna de neoantígeno de ARNm. En algunas formas de realización, la combinación además comprende al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco terapias adicionales.

[0871] En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico (a) administrando al sujeto una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; (b) detectando uno o más neoantígenos en el sujeto después de la administración del modulador de empalme, ADC o composición; (c) comparando el uno o más neoantígenos con un panel de neoantígenos universales; y (d) administrando al sujeto una vacuna de neoantígeno universal que comprende al menos un neoantígeno universal presente en el sujeto. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno universal se administra sola o en combinación con al menos una terapia adicional. En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco terapias adicionales.

[0872] En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende la administración repetida del modulador de empalme, ADC o composición. En algunas formas de realización, la repetida del modulador de empalme, ADC o composición se inicia antes de la administración de la vacuna de neoantígeno universal. En algunas formas de realización, la administración repetida del modulador de empalme, ADC o composición se inicia después de la administración de la vacuna de neoantígeno universal. En algunas formas de realización, la administración repetida del modulador de empalme, ADC o composición se inicia concurrentemente con la administración de la vacuna de neoantígeno universal. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, ADC o composición usada para administración repetida se reduce en comparación con la cantidad usada para la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, ADC o composición usada para la administración inicial y/o repetida se reduce en comparación con una dosis

estándar del modulador de empalme, ADC o composición cuando se usa sin un tratamiento de vacuna. En algunas formas de realización, la cantidad del modulador de empalme, ADC o composición usada para la administración inicial y/o repetida se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosis estándar del modulador de empalme, ADC o composición.

[0873] En algunas formas de realización, la al menos una terapia adicional comprende administrar un inhibidor de punto de control (por ejemplo, cualquiera de los inhibidores de punto de control ejemplares descritos en la presente). En algunas formas de realización, la administración del inhibidor de punto de control se inicia antes de la administración de la vacuna de neoantígeno universal y/o la administración repetida del modulador de empalme, ADC o composición. En algunas formas de realización, la administración del inhibidor de punto de control se inicia después de la administración de la vacuna de neoantígeno universal y/o la repetida del modulador de empalme, ADC o composición. En algunas formas de realización, la administración del inhibidor de punto de control se inicia concurrentemente con la administración de la vacuna de neoantígeno universal y/o la administración repetida del modulador de empalme, ADC o composición. En algunas formas de realización, la administración del inhibidor de punto de control se repite al menos una vez después de la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del inhibidor de punto de control usada para administración repetida se reduce en comparación con la cantidad usada para la administración inicial. En algunas formas de realización, la cantidad del inhibidor de punto de control usada para administración repetida se reduce en comparación con una dosis estándar del inhibidor de punto de control. En algunas formas de realización, la cantidad del inhibidor de punto de control usada para administración repetida se reduce en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% o 90% en comparación con una dosis estándar del inhibidor de punto de control. En algunas formas de realización, el sujeto es intolerante, no responde o responde poco al inhibidor de punto de control cuando se administra solo.

[0874] También se proporcionan en la presente, en diversas formas de realización, vacunas de neoantígeno que comprenden al menos un péptido neoantígeno o al menos un ARNm de neoantígeno. En algunas formas de realización, una vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno. En algunas otras formas de realización, una vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno.

[0875] También se proporcionan en la presente, en diversas formas de realización, kits que comprenden un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; y una vacuna de neoantígeno (por ejemplo, una vacuna de neoantígeno universal). En algunas formas de realización, la vacuna de

neoantígeno es un péptido o vacuna de neoantígeno de ARNm. En algunas formas de realización, el kit además comprende uno o más componentes adicionales, que incluyen, sin limitaciones: instrucciones de uso; otros agentes, por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos adicionales; dispositivos, envases u otros materiales para preparar el modulador de empalme, ADC, composición y/o vacuna de neoantígeno para la administración terapéutica; portadores farmacéuticamente aceptables; y dispositivos, envases u otros materiales para administrar el modulador de empalme, ADC, composición y/o vacuna de neoantígeno a un paciente. Las instrucciones de uso pueden incluir una guía para aplicaciones terapéuticas, incluyendo dosis y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, en un paciente que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico. En diversas formas de realización, el kit además contiene instrucciones para el uso terapéutico, por ejemplo, el uso del modulador de empalme, ADC o composición, y la vacuna de neoantígeno para tratar o prevenir un trastorno neoplásico en un paciente. En diversas formas de realización, el kit además contiene al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, para administrar junto con el modulador de empalme, ADC o composición, y la vacuna de neoantígeno, por ejemplo, un inhibidor de punto de control). En diversas formas de realización, el modulador de empalme, ADC, composición y/o vacuna de neoantígeno se formula como una composición farmacéutica.

[0876] En algunas formas de realización de los métodos y composiciones divulgados en la presente, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud.

[0877] En algunas formas de realización, el al menos un péptido neoantígeno comprende una o más de una secuencia de neoantígenos. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

[0878] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos

comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o una porción antigénica de SEQ ID NO: 66. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica no se superpone exclusivamente o consiste en la secuencia peptídica canónica (por ejemplo, cualquiera de las secuencias peptídicas canónicas ejemplares subrayadas en la Tabla 21).

[0879] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una secuencia de neoantígenos específica para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno personalizada para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en el sujeto.

[0880] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una secuencia de neoantígenos universal. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno universal. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% de los sujetos de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de generar una respuesta de células T contra un tumor presente en al menos 1%, al menos 5% o al menos 10% de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico.

[0881] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos ha sido identificada secuenciando al menos un péptido neoantígeno inducido en el sujeto administrando una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el al menos un

péptido neoantígeno comprende una secuencia de neoantígenos inducida al poner en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en un cultivo celular *in vitro*. En algunas formas de realización, la célula neoplásica se obtiene del sujeto. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en el sujeto.

[0882] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno o ARNm y un portador farmacéuticamente aceptable. En diversas formas de realización, un péptido neoantígeno o ARNm se puede unir a un portador adecuado para ayudar a generar una respuesta inmune. Los portadores ejemplares para unirse a agentes inmunogénicos (por ejemplo, un péptido neoantígeno o ARNm) incluyen albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, toxoide del tétanos o un toxoide de otras bacterias patogénicas, tales como difteria, *E. coli*, cólera o *H. pilori*, o un derivado de toxina atenuado. Otros portadores para estimular o mejorar una respuesta inmune incluyen citoquinas tales como IL–1, IL–1α y péptidos β, IL–2, γINF, IL–10, GM–CSF, y quimioquinas, tales como M1P1α y β y RANTES. Los agentes inmunogénicos también se pueden unir a péptidos que mejoran el transporte entre tejidos, como se describe, por ejemplo, en WO 97/17613 y WO 97/17614. En algunas formas de realización, el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona de un péptido, una albúmina sérica, una hemocianina de lapa californiana, una inmunoglobulina, una tiroglobulina, una ovalbúmina, un toxoide o un derivado de toxoide atenuado, una citoquina, y una quimioquina.

[0883] En algunas formas de realización, el péptido neoantígeno o ARNm se puede unir al portador farmacéuticamente aceptable. Los agentes inmunogénicos se pueden unir a portadores por entrecruzamiento químico. Las técnicas para unir un péptido inmunogénico con un portador incluyen la formación de enlaces disulfuro usando N–succinimidil–3–(2–piridil–tio) propionato (SPDP) y succinimidil 4–(N–maleimidometil)ciclohexan–1–carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, esto se puede lograr por adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos y el péptido cisteína reside en una proteína y un enlace amida a través del amino épsilon en una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Una variedad de dichos agentes formadores de disulfuro / amida se describen en Jansen *et al.* ((1982) Immun Rev. 62:185). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter están disponibles comercialmente e incluyen ésteres reactivos de

ácido 6–maleimidocaproico, ácido 2–bromoacético y ácido 2–iodoacético, ácido 4–(N–maleimido–metil)ciclohexan–1–carboxílico. Los grupos carboxilo se pueden activar combinándolos con succinimida o ácido 1–hidroxil–2–nitro–4–sulfónico, sal de sodio. En algunas formas de realización, el péptido neoantígeno y el portador farmacéuticamente aceptable están unidos covalentemente a través de un enlazador.

[0884] Los neoantígenos y otros péptidos inmunogénicos similares también se pueden expresar como proteínas de fusión con portadores. El péptido inmunogénico se puede unir en el término amino, el término carboxilo, o en un sitio en cualquier parte del péptido (internamente) con el portador. En algunas formas de realización, múltiples repeticiones del péptido inmunogénico pueden estar presentes en la proteína de fusión. En algunas formas de realización, el péptido neoantígeno y el portador farmacéuticamente aceptable se expresan como una proteína de fusión.

[0885] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno o su ARNm codificante y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un péptido neoantígeno o su ARNm codificante y un adyuvante farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un adyuvante como se describe en la presente).

[0886] En algunas formas de realización de los métodos y composiciones divulgados en la presente, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno. En algunas formas de realización, el al menos un ARNm de neoantígeno codifica una o más de una secuencia de neoantígenos. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

[0887] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o una porción antigénica de SEQ ID NO: 66. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila

de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos y/o porción antigénica no se superpone exclusivamente o consiste en la secuencia peptídica canónica (por ejemplo, cualquiera de las secuencias peptídicas canónicas ejemplares subrayadas en la Tabla 21).

[0888] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una secuencia de neoantígenos específica para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno personalizada para el sujeto. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en el sujeto.

[0889] En algunas otras formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una secuencia de neoantígenos universal. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es una vacuna de neoantígeno universal. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de unirse a al menos un alelo de HLA expresado en al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% de los sujetos de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico. En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos es capaz de generar una respuesta de células T contra un tumor presente en al menos 1%, al menos 5% o al menos 10% de una población de sujetos que sufren el trastorno neoplásico.

[0890] En algunas formas de realización, la secuencia de neoantígenos ha sido identificada secuenciando al menos un ARNm de neoantígeno inducido en el sujeto administrando una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, el al menos un ARNm de neoantígeno codifica una secuencia de neoantígenos inducida al poner en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva del modulador de empalme, el conjugado anticuerpo–fármaco o la composición. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en un cultivo celular *in vitro*. En algunas formas de realización, la célula neoplásica se obtiene del sujeto. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en el sujeto.

[0891] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al

menos un ARNm de neoantígeno y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el al menos un ARNm de neoantígeno está unido al portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona de un péptido, una albúmina sérica, una hemocianina de lapa californiana, una inmunoglobulina, una tiroglobulina, una ovalbúmina, un toxoide o un derivado de toxoide atenuado, una citoquina, y una quimioquina.

[0892] En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la vacuna de neoantígeno comprende al menos un ARNm de neoantígeno y un adyuvante farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un adyuvante como se describe en la presente).

[0893] En algunas formas de realización, el ARNm de neoantígeno está encapsulado por un agente encapsulante. En algunas formas de realización, el agente encapsulante protege el ARNm de neoantígeno de la degradación y mejora la administración de la vacuna (McNamara *et al.* (2015) J Immunol Res. 2015:794528). En algunas formas de realización, el agente encapsulante es un liposoma. En algunas formas de realización, el liposoma es un liposoma catiónico tal como cloruro de N–[1–(2,3–dioleoloxi)propil]–N,N,N–trimetilamonio (DOTAP). En algunas formas de realización, el agente encapsulante es una nanopartícula. En algunas formas de realización, la nanopartícula protege el ARNm de neoantígeno de la degradación de nucleasa y/o mejora la captación celular y/o la eficiencia de administración. En algunas formas de realización, la nanopartícula se puede diseñar para que sea completamente degradable. En algunas formas de realización, la nanopartícula es una nanopartícula de estructura núcleo–cubierta biodegradable con un núcleo sensible al pH de poli–(b–aminoéster) (PBAE) rodeado por una cubierta de fosfolípido (Su *et al.* (2011) Mol Pharm. 8(3):774–87). En algunas formas de realización, dichas nanopartículas son particularmente eficientes en la administración de ARNm *in vivo* y la generación de una respuesta inmune antitumoral.

[0894] En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 150 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 100 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una carga mutacional no sinónima de aproximadamente 50 mutaciones o menos. En algunas formas de realización, el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico, por ejemplo, una neoplasia maligna hematológica o un tumor sólido. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de una neoplasia maligna de

células B, una leucemia, un linfoma y un mieloma. En algunas formas de realización, la neoplasia maligna hematológica se selecciona de leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de útero, carcinoma de conductos salivales, melanoma, cáncer de colon, cáncer de cérvix, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama HER2–positivo, adenocarcinoma gástrico, cáncer de próstata y osteosarcoma.

[0895] Tal como se usa en la presente, "adyuvante" se refiere a una sustancia que es capaz de aumentar, amplificar o modular una respuesta inmune a un agente inmunogénico acompañante, por ejemplo, un péptido neoantígeno o ARNm. En ciertas formas de realización, un neoantígeno de la presente divulgación se puede administrar en combinación con adyuvantes, es decir, sustancias que no causan ellas mismas respuestas inmunes adaptativas, pero que amplifican o modular la respuesta a un neoantígeno acompañante. Se puede usar una variedad de adyuvantes en combinación con los neoantígenos divulgados, a fin de generar una respuesta inmune. En algunas formas de realización, los adyuvantes se seleccionan para aumentar la respuesta intrínseca al neoantígeno sin causar cambios conformacionales en el neoantígeno que afectarían la forma cualitativa de la respuesta. En algunas formas de realización, los adyuvantes se seleccionan para mejorar el cebado y/o la activación de células T efectoras (por ejemplo, CD8).

[0896] En ciertas formas de realización, el adyuvante es una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como lípido monofosforilo A 3 de–O–acilado (MPL) o 3–DMP, aminoácidos poliméricos o monoméricos, tales como ácido poliglutámico o polilisina. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N–acetilmuramil–L–treonil–D–isoglutamina (thr–MDP), N–acetil–normuramil–L–alanil–D–isoglutamina (nor–MDP), N–acetilmuramil–L–alanil–D–isoglutaminil–L–alanina–2–(1'–2'dipalmitoil–sn–glicero–3–hidroxifosforiloxi)–etilamina (MTP–PE), N–acetilglucosaminil–N–acetilmuramil–L–Al–D–isoglu–L–Ala–dipalmitoxi propilamida (DTP–DPP)), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua e incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene 5% escualeno, 0.5% Tween 80 y 0.5% Span 85 (y contienen opcionalmente distintas cantidades de MTP–PE) formuladas en partículas submicrónicas que usan un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics), (b) SAF, que

contiene 10% escualeno, 0.4% Tween 80, 5% polímero bloqueado con Pluronic L121 y thr–MDP, ya sea microfluidificado en una emulsión submicrónica o sometido a vórtex para generar una emulsión con un tamaño de partícula mayor, y (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi ImmunoChem) que contiene 2% escualeno, 0.2% Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en lípido monofosforilo A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), por ejemplo MPL–FCWS (Detox™). En algunas formas de realización, el adyuvante es una saponina, tal como Stimulon™ (QS21) o partículas generadas a partir de ella, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA), citoquinas, tales como interleuquinas (IL–1, IL–2 e IL–12), factor estimulante de colonias de macrófagos (M–CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF).

[0897] Un adyuvante se puede administrar con un agente inmunogénico (por ejemplo, un péptido neoantígeno o ARNm) como composición única, o se puede administrar antes, en forma concurrente o después de la administración del agente inmunogénico. En algunas formas de realización, el agente inmunogénico y el adyuvante se pueden envasar y suministrar en el mismo vial, o se pueden envasar en viales separados y mezclar antes del uso. En algunas formas de realización, el agente inmunogénico y el adyuvante se pueden envasar con una etiqueta, que indica la aplicación terapéutica prevista. En algunas formas de realización, si el agente inmunogénico y el adyuvante se envasan por separado, el envase puede incluir instrucciones para mezclar antes de usar. La elección de adyuvante y/o portador depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el cronograma posológico, la eficacia del adyuvante para la especie que esté siendo vacunada, y, en humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o es aprobable para administración humana por los organismos regulatorios pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para administración humana. Sin embargo, las sales de aluminio, el MPL o el adyuvante incompleto de Freund (Chang *et al.* (1998) Adv Drug Deliv Rev. 32:173–186), solos u opcionalmente en combinación con cualquiera de sales de aluminio, QS21 y MPL y todas sus combinaciones, son adecuados para la administración humana.

[0898] En diversas formas de realización, la presente divulgación además proporciona métodos para detectar e identificar al menos un neoantígeno. Más específicamente, en diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para identificar al menos un neoantígeno (a) poniendo en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una

composición que comprende un modulador de empalme o ADC; (b) detectando al menos un transcripto de ARNm alternativamente empalmado después de poner en contacto la célula neoplásica con el modulador de empalme, ADC o composición; (c) prediciendo la traducción del al menos un transcripto de ARNm alternativamente empalmado en al menos un péptido; y (d) comparando el al menos un péptido con un proteoma de referencia, en donde se identifica al menos un neoantígeno si el al menos un péptido no coincide con ningún péptido en el proteoma de referencia. En diversas formas de realización, el método además comprende poner en contacto una o más células neoplásicas adicionales para identificar al menos un neoantígeno universal. En diversas formas de realización, el método se repite en una o más células neoplásicas adicionales o muestras (por ejemplo, una biopsia de tejido) para confirmar los neoantígenos adecuados (por ejemplo, para usar en una vacuna de neoantígeno) y/o para identificar uno o más neoantígenos universales.

[0899] En diversas otras formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para identificar al menos un neoantígeno (a) poniendo en contacto una célula neoplásica con una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; (b) detectando al menos un péptido que comprende una secuencia de neoantígenos potencial después de poner en contacto la célula neoplásica con el modulador de empalme, ADC o composición; y (c) comparando el al menos un péptido con un proteoma de referencia, en donde se identifica al menos un neoantígeno si el al menos un péptido no coincide con ningún péptido en el proteoma de referencia. En diversas formas de realización, el método además comprende poner en contacto una o más células neoplásicas adicionales para identificar al menos un neoantígeno universal. En diversas formas de realización, el método se repite en una o más células neoplásicas adicionales o muestras (por ejemplo, una biopsia de tejido) para confirmar los neoantígenos adecuados (por ejemplo, para usar en una vacuna de neoantígeno) y/o para identificar uno o más neoantígenos universales.

[0900] En algunas formas de realización de los métodos de identificación de neoantígenos descritos en la presente, la detección de al menos un transcripto de ARNm alternativamente empalmado comprende RNAseq. En algunas formas de realización, la predicción de la traducción del al menos un transcripto de ARNm alternativamente empalmado comprende cuantificar el cambio en el valor de empalme porcentual (dPSI) para el al menos un transcripto. En algunas formas de realización, la predicción de la traducción del al menos un transcripto de ARNm alternativamente empalmado comprende RiboSeq y/o perfilado ribosomal.

[0901] En algunas formas de realización de los métodos de identificación de

neoantígenos descritos en la presente, los métodos además comprenden evaluar el al menos un péptido para predecir la unión al complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). En algunas formas de realización, la unión al MHC predicha se determina midiendo la fuerza de unión predicha por afinidad en bruto del al menos un péptido. En algunas formas de realización, una fuerza de unión predicha por afinidad en bruto de aproximadamente 500 nM o más indica unión al MHC. En algunas formas de realización, la unión al MHC predicha se determina identificando una distribución de fuerzas de unión predichas para una serie de péptidos aleatorios; y comparando la fuerza de unión predicha del al menos un péptido con la distribución. En algunas formas de realización, una fuerza de unión predicha en el 2.0% superior de la distribución indica una unión débil al MHC. En algunas formas de realización, una fuerza de unión predicha en el 0.5% superior de la distribución indica una unión fuerte al MHC.

[0902] En algunas formas de realización de los métodos de identificación de neoantígenos descritos en la presente, la célula neoplásica está presente en un cultivo celular *in vitro*. En algunas formas de realización, la célula neoplásica se obtiene del sujeto. En algunas formas de realización, la célula neoplásica está presente en el sujeto.

[0903] También se proporcionan en la presente, en diversas formas de realización, métodos para elaborar una vacuna de neoantígeno (a) identificando al menos un neoantígeno (por ejemplo, al menos un péptido neoantígeno o su ARNm codificante) usando cualquiera de los métodos de identificación ejemplares divulgados en la presente; y (b) formulando el al menos un neoantígeno junto con un portador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, cualquiera de los portadores, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables descritos en la presente). En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 37–65. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 46–49.

[0904] En algunas otras formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 66–93. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, o una porción antigénica de SEQ ID NO: 66. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna comprende una

secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77, o una porción antigénica de cualquiera de SEQ ID NOs: 74–77. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno y/o porción antigénica oscila de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno y/o porción antigénica no se superpone exclusivamente o consiste en la secuencia peptídica canónica (por ejemplo, cualquiera de las secuencias peptídicas canónicas ejemplares subrayadas en la Tabla 21).

[0905] En algunas formas de realización, el al menos un neoantígeno usado en la vacuna está unido al portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona de un péptido, una albúmina sérica, una hemocianina de lapa californiana, una inmunoglobulina, una tiroglobulina, una ovalbúmina, un toxoide o un derivado de toxoide atenuado, una citoquina y una quimioquina.

Combinación de modulador de empalme / ADC y células T modificadas por ingeniería genética (CAR–T):

[0906] En diversas formas de realización, un paciente que tiene un cáncer según se describe en la presente se puede tratar con una combinación de un modulador de empalme, ADC o composición y una o más células T dirigidas al tumor modificadas por ingeniería genética (es decir, CAR–T). Así, en diversas formas de realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neoplásico mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un modulador de empalme, un ADC, o una composición que comprende un modulador de empalme o ADC; y células T dirigidas al tumor modificadas por ingeniería genética (es decir, CAR–T). En diversas formas de realización, un receptor de células T quimérico se puede modificar usando secuencias de reconocimiento de antígeno que son reactivas con un neoantígeno identificado.

[0907] Por ejemplo, en diversas formas de realización, a fin de apuntar a cambios inducidos por modulador de empalme o ADC en los dominios extracelulares de las proteínas de superficie celular, un receptor de células T quimérico reactivo al antígeno (CAR) se puede modificar identificando primero anticuerpos que reconocen un dominio de

proteína de neoantígeno expresado en superficie celular. Las secuencias de reconocimiento de antígeno de tales anticuerpos pueden entonces fusionarse con un dominio de receptor de células T para el direccionamiento selectivo y la activación.

[0908] En diversas otras formas de realización, se emplea una estrategia que integra la maquinaria de presentación de antígeno de las células tumorales junto con neoantígenos derivados de modulador de empalme o ADC. En algunas formas de realización, las células que contienen alelos de HLA conocidos y frecuentemente representados (por ejemplo, HLA–A*02:01) se pueden tratar con un modulador de empalme, ADC o composición y los antígenos unidos a MHC1 se identifican por ligandomics. En algunas formas de realización, estos péptidos se pueden usar para cebar y/o expandir células T a partir de donantes sanos que expresan el mismo alelo de HLA. Dichas células T, en algunas formas de realización, se pueden aislar, y las cadenas α y β del receptor de células T (TCR) se pueden secuenciar para identificar las regiones de reconocimiento/variables de antígenos cognados. En algunas formas de realización, un CAR cognado puede entonces ser modificado por ingeniería genética.

[0909] En algunas formas de realización, las secuencias de CAR se clonan en las poblaciones de células T derivadas de los pacientes y se expanden usando protocolos actualmente disponibles. En algunas formas de realización, las células T modificadas por ingeniería genética luego se vuelven a transfundir a la circulación del paciente, tras el tratamiento con un modulador de empalme, ADC o composición. Luego del tratamiento con el modulador de empalme, ADC o composición, en algunas formas de realización, las células tumorales pueden comenzar a presentar antígenos. En algunas formas de realización, la población de células T modificadas puede engancharse con y destruir células tumorales presentadoras de antígeno.

[0910] Resultará evidente para el especialista en el arte que pueden realizarse otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la divulgación aquí descrita, y que pueden realizarse usando equivalentes apropiados sin desviarse del alcance de la divulgación o las formas de realización divulgadas en la presente. Habiendo ahora descrito la divulgación en detalle, esta se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen con fines ilustrativos únicamente y no tienen por fin ser limitantes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

[0911] Se describen métodos de síntesis para cargas útiles, enlazadores y compuestos conjugables de enlazador–carga útil (enlazador–fármaco, L–D), que tienen las estructuras mostradas en las Tablas 7–9. Los compuestos conjugables de enlazador–carga

útil se usaron en la preparación de conjugados anticuerpo–fármaco (ADC). Los ADC ejemplares se describen en los Ejemplos 3–5.

1.1 Reactivos y materiales

[0912] Los materiales de partida utilizados en los siguientes métodos de síntesis están disponibles comercialmente o pueden prepararse fácilmente mediante métodos estándar a partir de materiales conocidos. Los compuestos conjugables de enlazador–carga útil divulgados pueden prepararse usando las reacciones y técnicas descritas en este documento. En la descripción de los métodos sintéticos a continuación, debe entenderse que todas las condiciones de reacción propuestas, incluyendo la elección del solvente, la atmósfera de reacción, la temperatura de reacción, la duración del experimento y los procedimientos de elaboración, pueden elegirse como las condiciones estándar para esa reacción, a menos que se indique lo contrario. Un experto en la técnica de la síntesis orgánica entiende que la funcionalidad presente en diversas porciones de la molécula debe ser compatible con los reactivos y las reacciones propuestas. Los sustituyentes no compatibles con las condiciones de reacción son evidentes para el experto en la técnica, y por lo tanto se indican métodos alternativos en este documento.

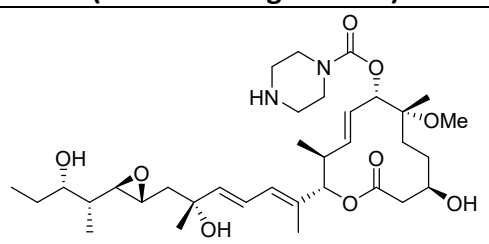
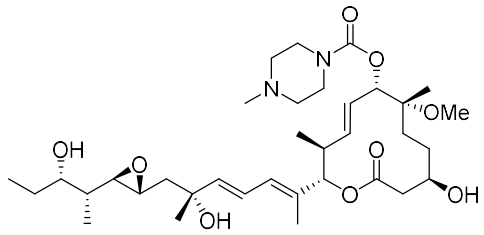
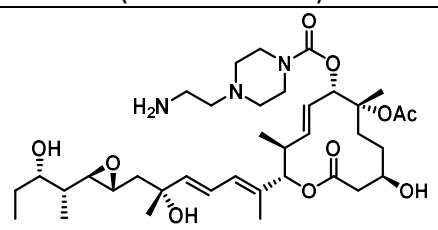
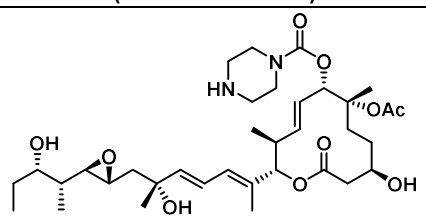
[0913] La cromatografía líquida preparativa–espectrometría de masas (LC/MS) se llevó a cabo utilizando un Sistema de Purificación Automática Aguas y una columna XTerra MS C18 (5 µm, 19 mm x 100 mm) en condiciones de fase móvil ácida. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron a 400 MHz utilizando un instrumento Varian (Agilent Technologies). El calentamiento por microondas se realizó utilizando un microondas Biotage Emrys Liberator o Initiator. La cromatografía en columna se llevó a cabo utilizando un Teledyne Isco Combiflash Rf200d. La eliminación del solvente se llevó a cabo utilizando un evaporador rotatorio Büchi o un evaporador centrífugo Genevac.

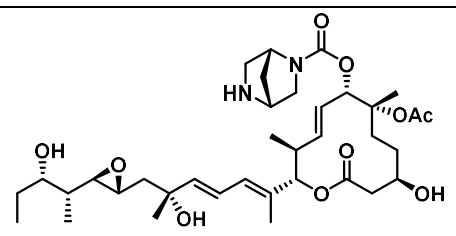
[0914] Términos / abreviaturas: Tal como se usa en este documento, el término "inerte" se refiere al reemplazo del aire en un reactor (por ejemplo, un recipiente de reacción, un matraz, un reactor de vidrio) con un gas inerte esencialmente libre de humedad, como nitrógeno o argón. Las siguientes abreviaturas se utilizan en este documento: DCM = diclorometano, DMF = dimetilformamida, HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento, KHMDS = bis(trimetilsilil)amida potásica, LC/MS = cromatografía líquida – espectrometría de masas, MeOH = metanol, RT = temperatura ambiente, TBSCl = cloruro de ter–butildimetilsililo, THF = tetrahidrofurano, TLC = cromatografía de capa delgada. Las multiplicidades se indican usando las siguientes abreviaturas: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, quintet = quinteto, sxt = sexteto, m = multiplete, dd = doblete de dobletes, ddd = doblete de dobletes de dobletes, dt = doblete de tripletes, br s = singlete ancho.

[0915] LC/MS: Fases móviles = A (0.1% ácido fórmico en H_2O) y B (0.1% ácido fórmico en acetonitrilo). Gradiente = B 5% a 95% en 1.8 minutos. Columna = columna Aguas Acquity BEH C18 (1.7 µm, 2.1 x 50 mm).

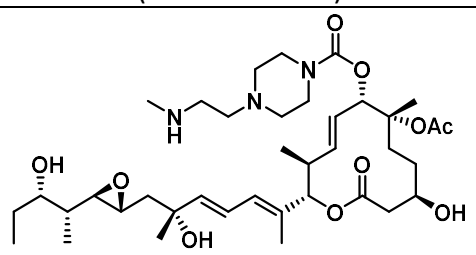
[0916] Referencias: Las patentes de EE. UU. Nros. 7.884.128 y 7.816.401 describen métodos ejemplares de síntesis de pladienolida B y D, y cada una se incorpora aquí por referencia para tales métodos. La síntesis de pladienolida B y D también se puede realizar utilizando los métodos ejemplares descritos en Kanada *et al.* ((2007) Angew Chem Int Ed. 46:4350–5). Kanada *et al.* y la Publicación Internacional Nro. WO 2003/099813 describen métodos ejemplares para sintetizar E7107 (D11) (Compuesto 45 de WO 2003/099813) a partir de pladienolida D (11107D de WO 2003/099813). Una patente correspondiente de EE. UU. Nro. 7.550.503 de Kotake *et al*. Cada una de estas referencias se incorpora aquí para los métodos de síntesis descritos.

Tabla 7. Estructuras de restos farmacológicos ejemplares (cargas útiles)

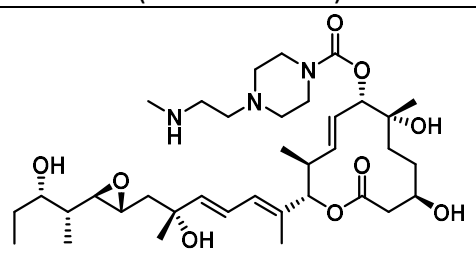
Estructura / ID de la carga útil (series de cargas útiles)
 D1 (Pladienolida D)
 D2 (Pladienolida D)
 D3 (Pladienolida D)
 D4 (Pladienolida D)



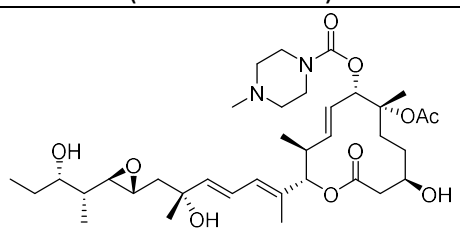
D5
(Pladienolida D)



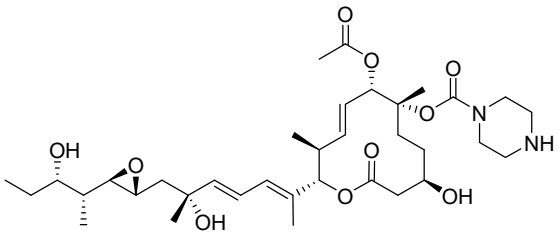
D6
(Pladienolida D)



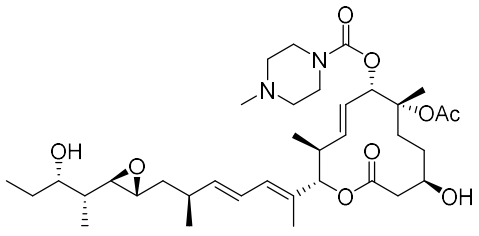
D7
(Pladienolida D)



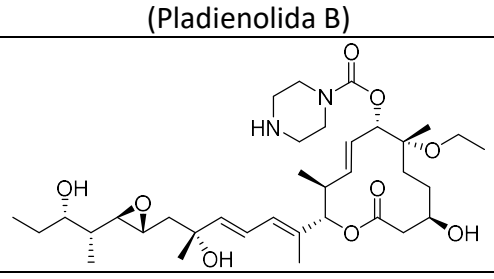
D4’
(Pladienolida D)

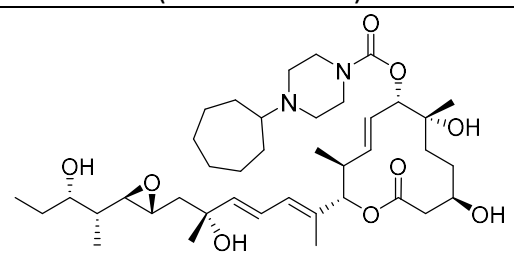
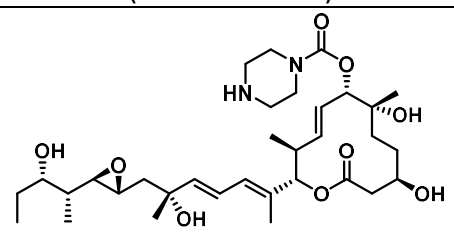
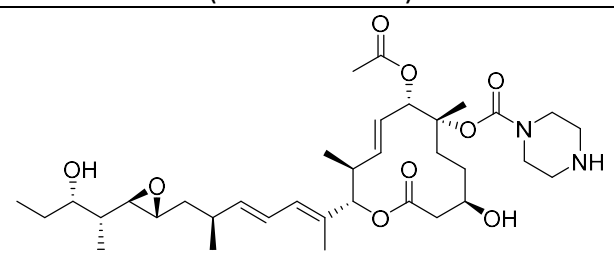
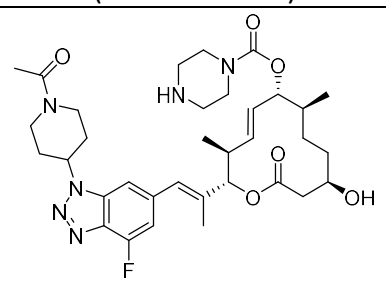
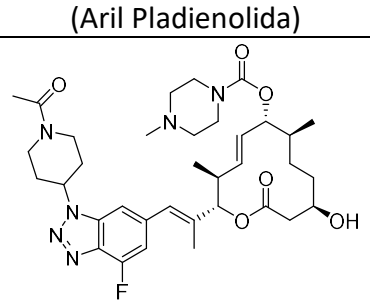
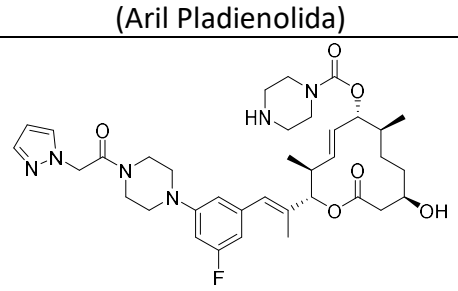


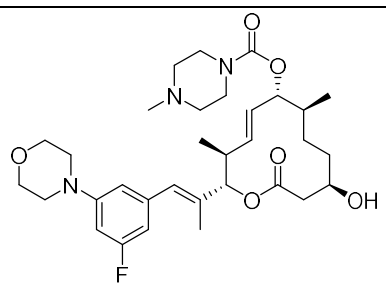
D8
(Pladienolida D)



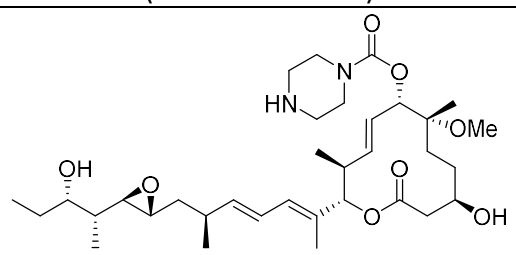
D9
(Pladienolida B)



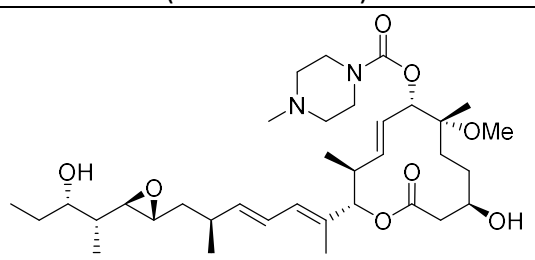
D10 (Pladienolida D)
 D11 (E7107) (Pladienolida D)
 D12 (Pladienolida D)
 D13 (Pladienolida B)
 D14 (Aril Pladienolida)
 D15 (Aril Pladienolida)
 D16 (Aril Pladienolida)



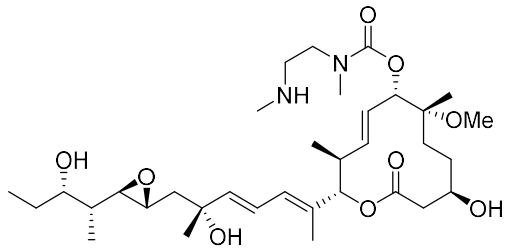
D17
(Aril Pladienolida)



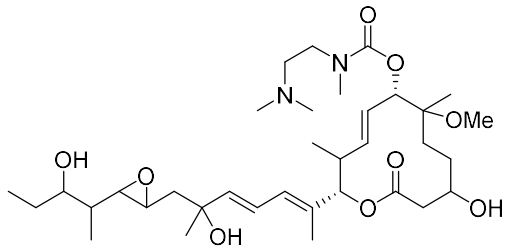
D18
(Pladienolida B)



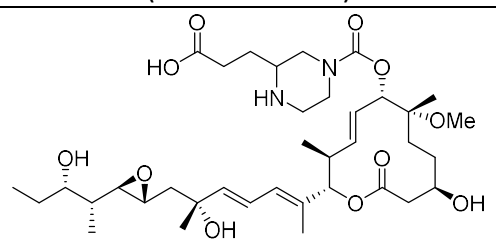
D19
(Pladienolida B)



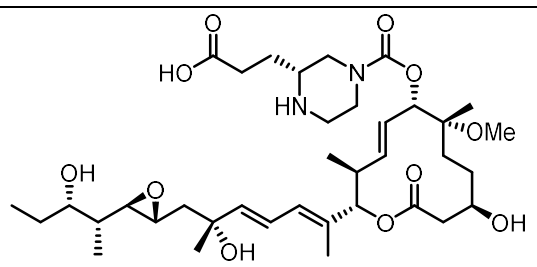
D20
(Pladienolida D)



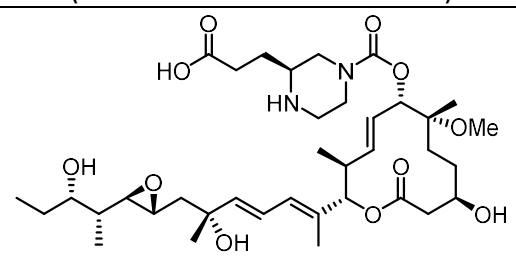
D21
(Pladienolida D)



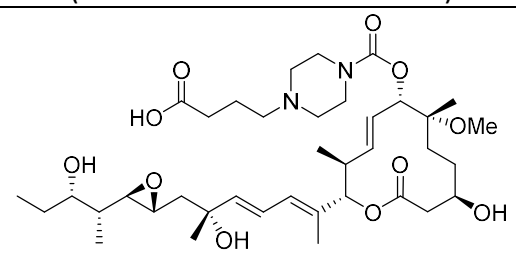
D22
(Pladienolida D Zwitteriónica)



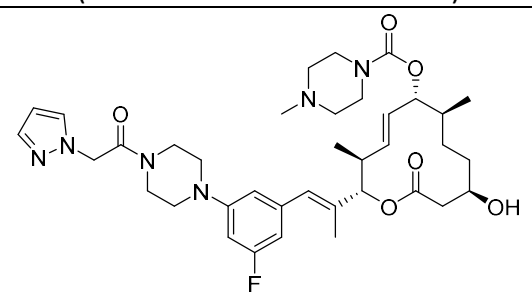
D23
(Pladienolida D Zwitteriónica)



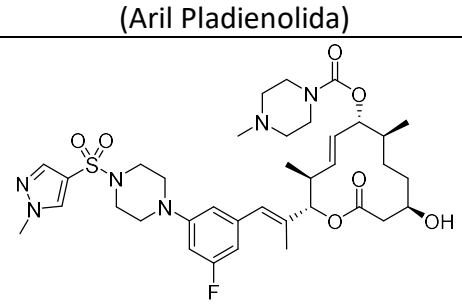
D24
(Pladienolida D Zwitteriónica)



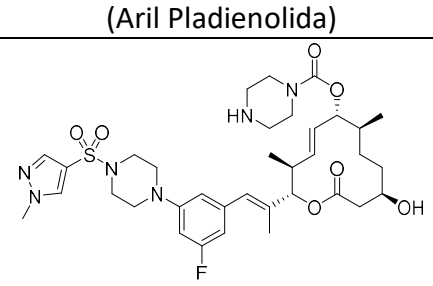
D25
(Pladienolida D Zwitteriónica)



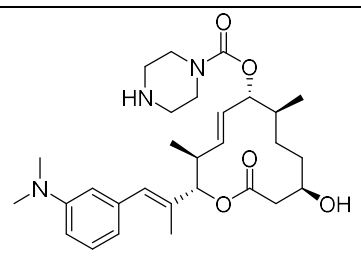
D26
(Aril Pladienolida)



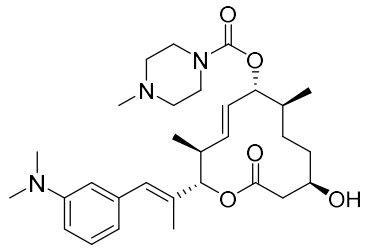
D27
(Aril Pladienolida)



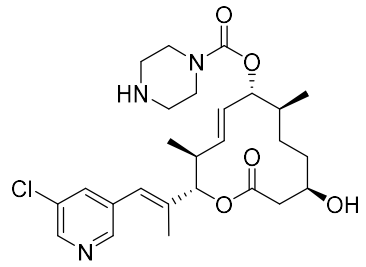
D28
(Aril Pladienolida)



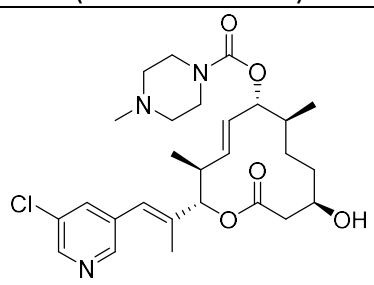
D29
(Aril Pladienolida)



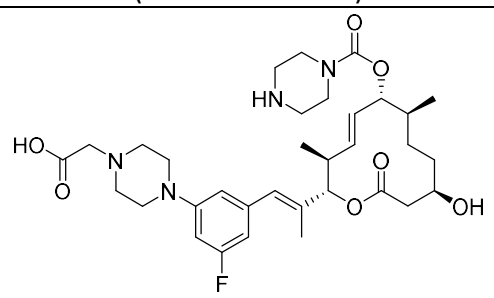
D30
(Aril Pladienolida)



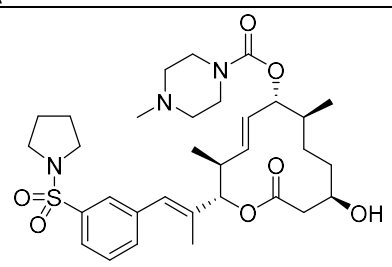
D31
(Aril Pladienolida)



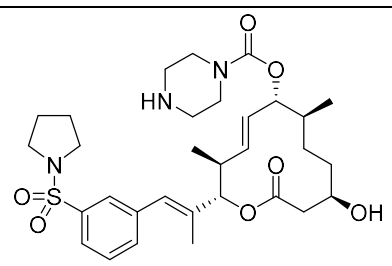
D32
(Aril Pladienolida)



D33
(Aril Pladienolida Zwitteriónica)

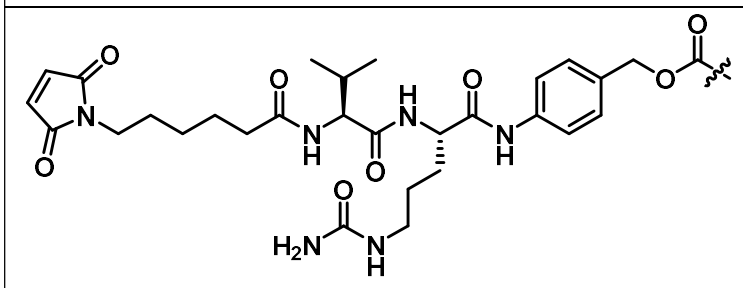
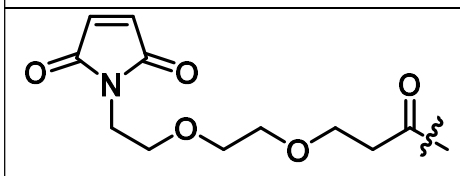
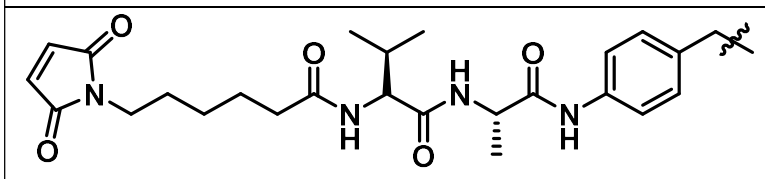
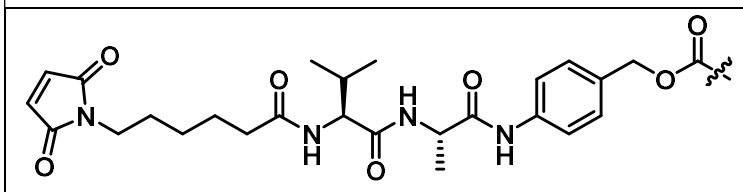


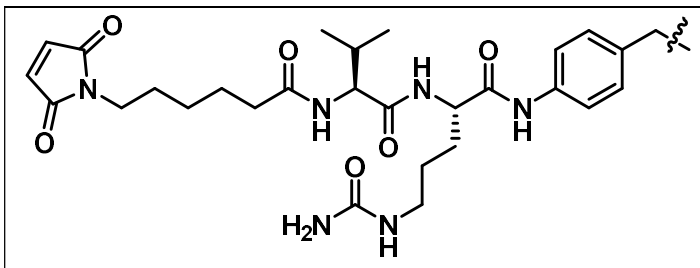
D34
(Aril Pladienolida Zwitteriónica)



D35
(Aril Pladienolida Zwitteriónica)

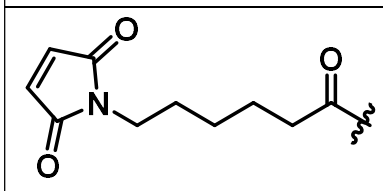
Tabla 8. Estructuras de enlazadores ejemplares

Estructura / ID del enlazador **(denominación IUPAC)**
 ADL1 – “MC–Val–Cit–pABC” (formiato de {4-[(2S)-5-(carbamoilamino)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido]-3-metilbutanamido]pentanamido]fenil}metio)
 ADL2 – “MC–$(PEG)_2$–CO” (3-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1–il)etoxi]etoxi}propanal)
 ADL5 – “MC–Val–Ala–pAB” (6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-[(1S)-2-metil-1-{[(1S)-1-[(4-metilfenil)carbamoil]etil]carbamoil}propil]hexanamida)
 ADL6 – “MC–Val–Ala–pABC” (formiato de {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido]-3-metilbutanamido]propanamido]fenil}metilo)



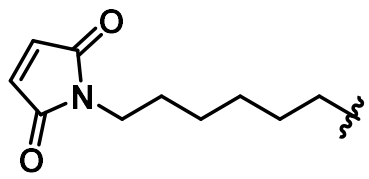
ADL7 – “MC–Val–Cit–pAB”

(N-[(1S)-1-{[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[(4–metilfenil)carbamoil]butil]carbamoil}-2-metilpropil]-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida)



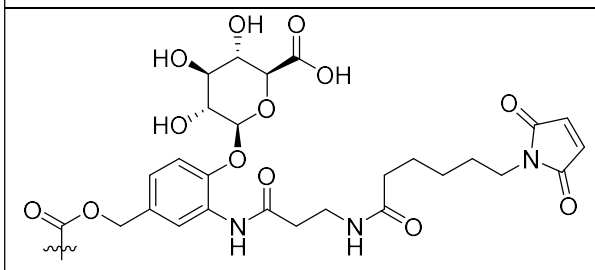
ADL10 – “MC”

(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanal)



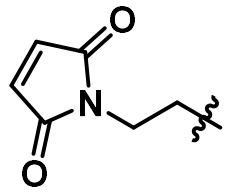
ADL12 – “Mal–Hex”

(1-hexil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2,5-diona)



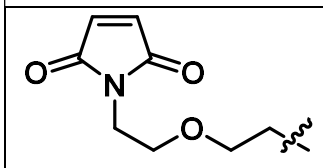
ADL13 – “MC–β–glucuronida”

(ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-{3-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido]propanamido}-4-[(formiloxi)metil]fenoxi)-3,4,5-trihidroxioxano-2-carboxílico)



ADL14 – “Mal–Et”

(1-etil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2,5-diona)



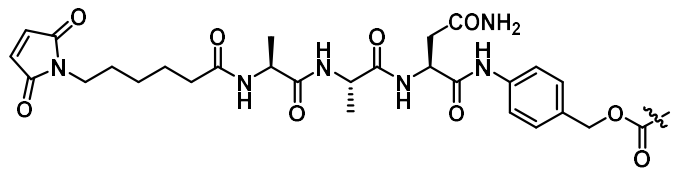
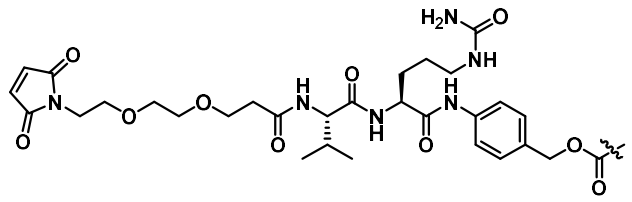
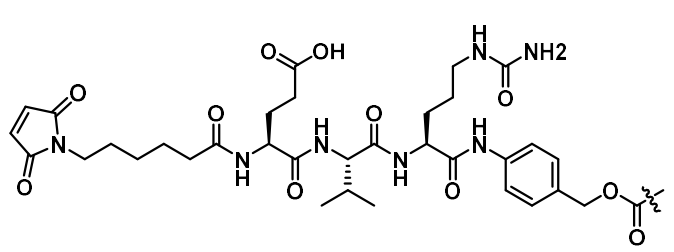
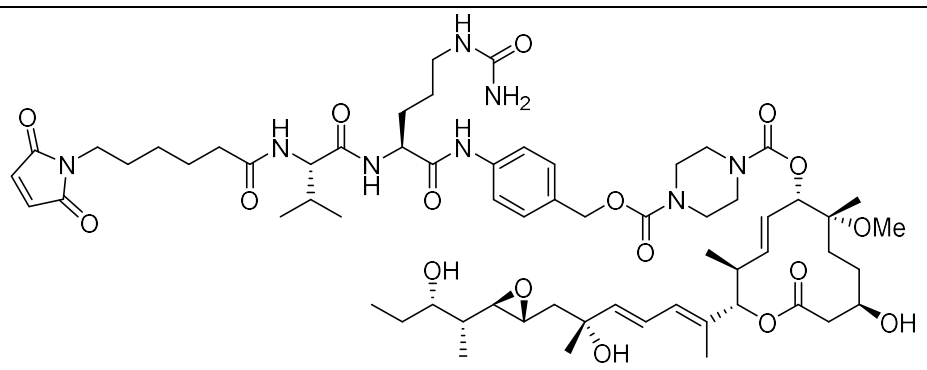
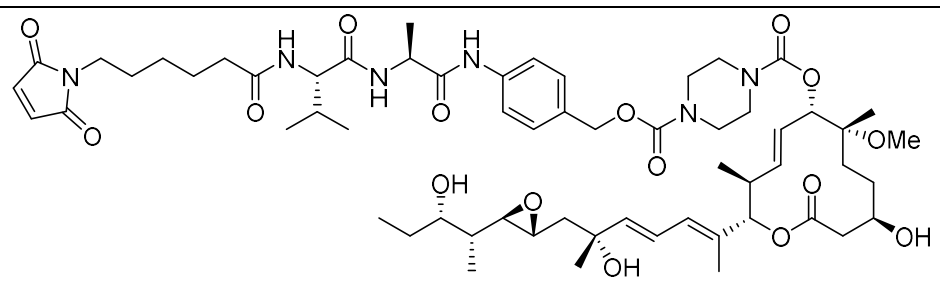
ADL15 – “Mal–Et–O–Et” (1-(2-etoxietil)-2,5-dihidro-1H-pirrol-2,5-diona)
 ADL21 – “MC–Ala–Ala–Asp–pABC”
 ADL22 – “Mc–PEG2–Val–Cit–pABC”
 ADL23 – “MC–Glu–Val–Cit–pABC”

Tabla 9. Estructuras de compuestos conjugables de enlazador–carga útil (L–D) ejemplares

 Fórmula química: $C_{63}H_{94}O_{17}$ Masa exacta: 1234,67 Peso molecular: 1235,48 ADL1-D1

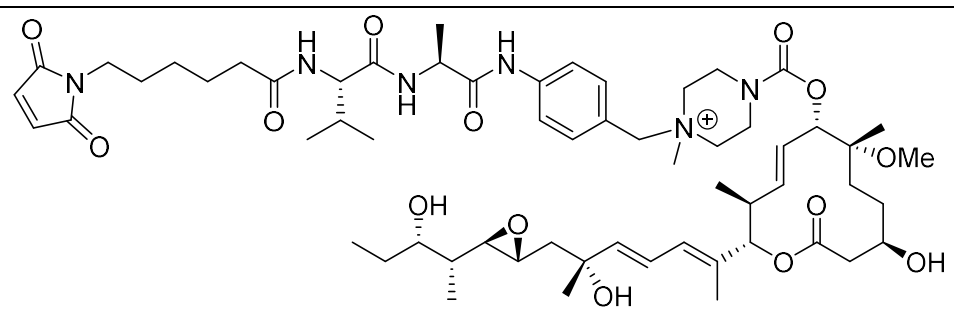


Fórmula Química: $C_{60}H_{88}N_6O_{16}$

Masa exacta: 1148,63

Peso molecular: 1149,39

ADL6-D1

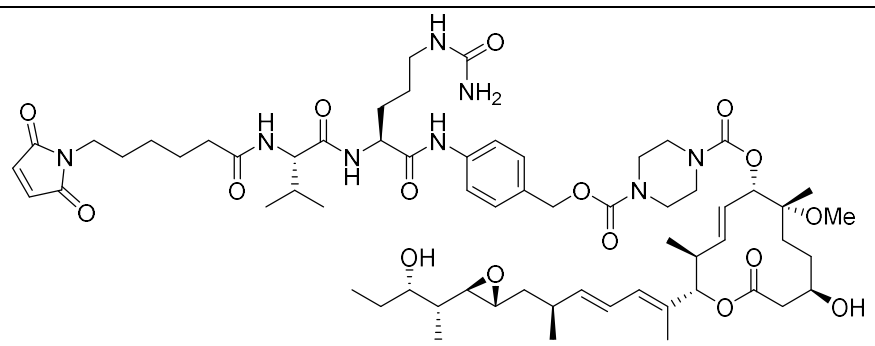


Fórmula Química: $C_{50}H_{91}N_6O_{14}^{+}$

Masa exacta: 1119,66

Peso molecular: 1120,42

ADL5-D2

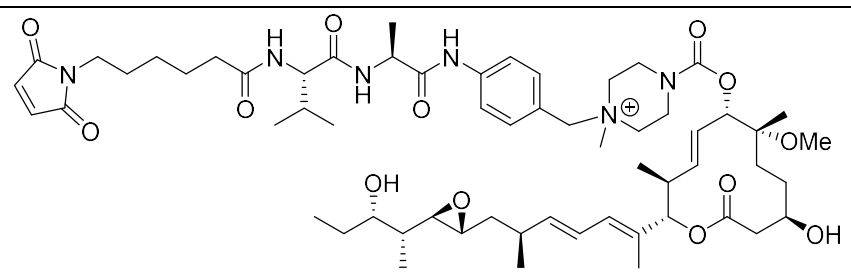


Fórmula química: $C_{63}H_{94}N_8O_{16}$

Masa exacta: 1218,68

Peso molecular: 1219,49

ADL1-D18

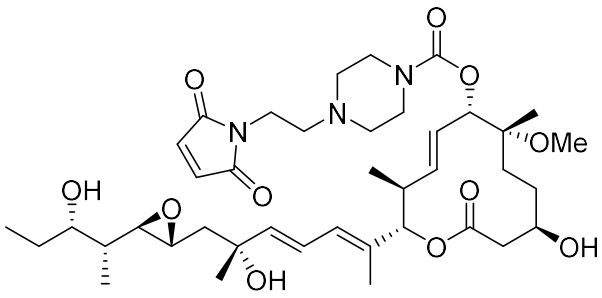


Fórmula química: $C_{60}H_{91}N_6O_{13}^{+}$

Masa exacta: 1103,66

Peso molecular: 1104,42

ADL5-D19

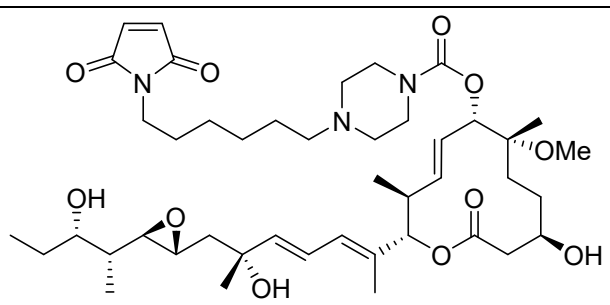


Fórmula química: $C_{40}H_{61}N_3O_{11}$

Masa exacta: 759,43

Peso molecular:759,43

ADL14-D1

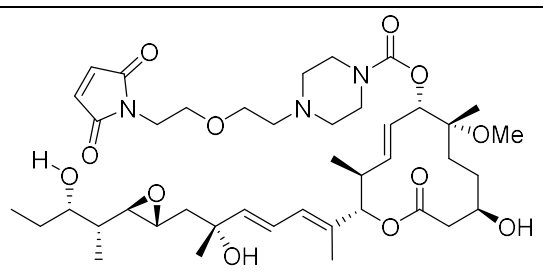


Fórmula química: $C_{44}H_{69}N_3O_{11}$

Masa exacta: 815,49

Peso molecular: 816,05

ADL12-D1

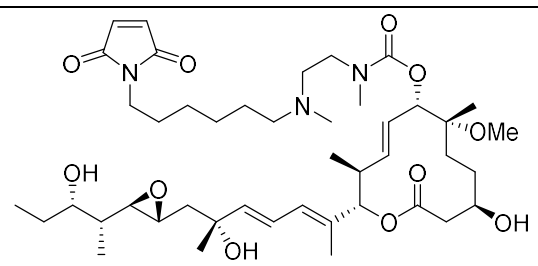


Fórmula química: $C_{42}H_{65}N_3O_{12}$

Masa exacta: 803,46

Peso molecular: 803,99

ADL15-D1

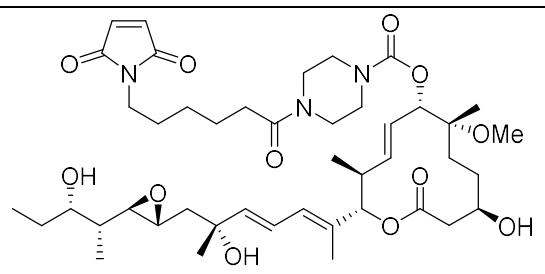


Fórmula química: $C_{44}H_{71}N_3O_{11}$

Masa exacta: 817,51

Peso molecular: 818,06

ADL12-D20

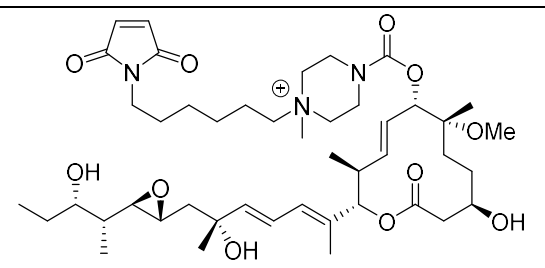


Fórmula química: $C_{44}H_{67}N_3O_{12}$

Masa exacta:829,47

Peso molecular: 803,03

ADL10-D1

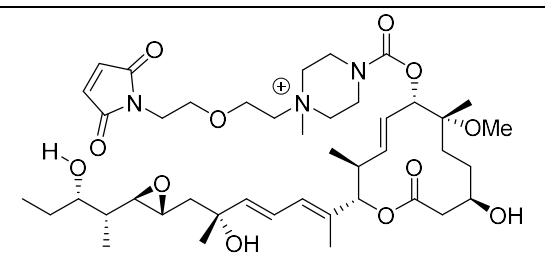


Fórmula química: $C_{45}H_{72}N_3O_{11}{}^+$

Masa exacta: 830,52

Peso molecular: 831,08

ADL12-D2

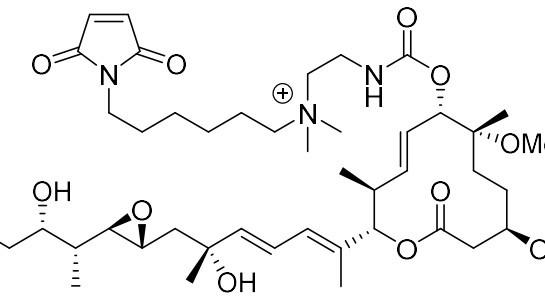


Fórmula química: $C_{43}H_{68}N_3O_{12}{}^+$

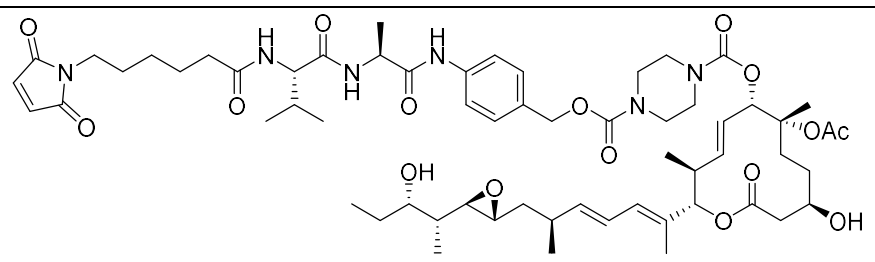
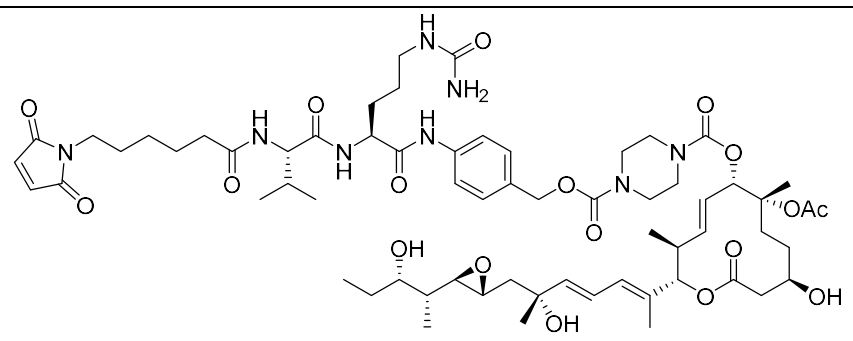
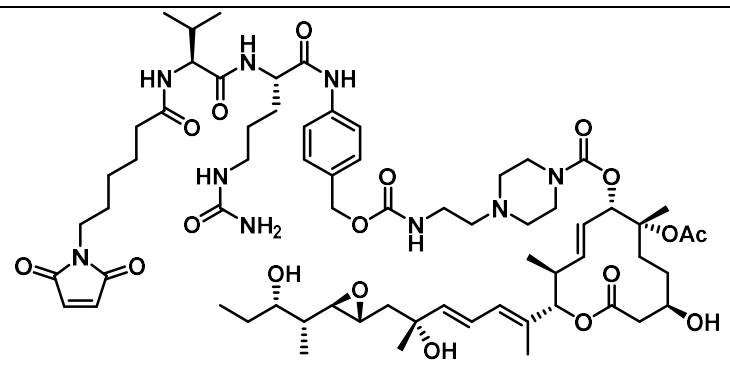
Masa exacta: 818,48

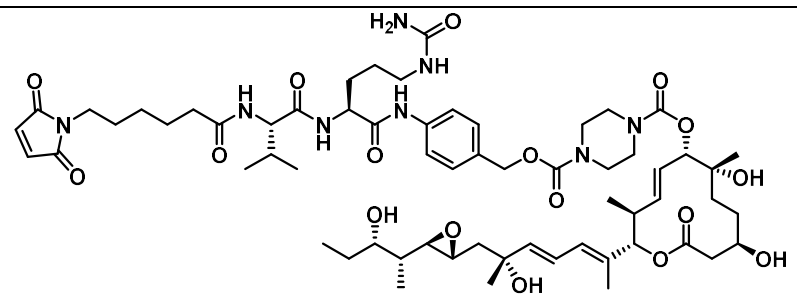
Peso molecular: 819,03

ADL15-D2



Fórmula química: $C_{44}H_{72}N_3O_{11}{}^+$

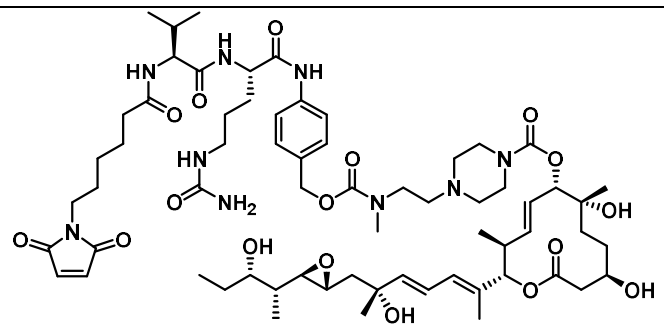
Masa exacta: 818,52 Peso molecular: 819,07 ADL12-D21
 Fórmula química: $C_{61}H_{88}N_6O_{16}$ Masa exacta: 1160,63 Peso molecular: 1161,40 ADL6-D9
 Fórmula química: $C_{64}H_{94}N_8O_{18}$ Masa exacta: 1262,67 Peso molecular: 1263,49 ADL1-D4
 Fórmula química: $C_{66}H_{99}N_9O_{18}$ Peso molecular: 1306,56 ADL1-D3



Fórmula química: $C_{62}H_{92}O_{17}$

Peso molecular: 1221,46

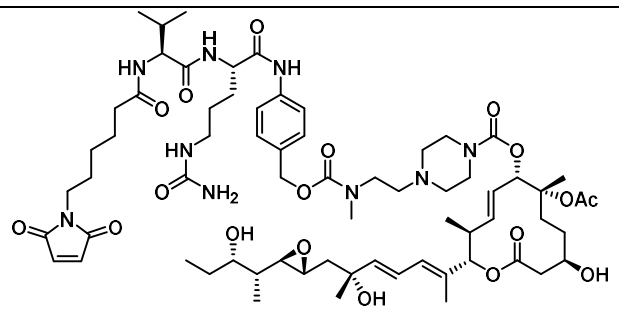
ADL1-D12



Fórmula química: $C_{65}H_{99}N_9O_{17}$

Peso molecular: 1278,55

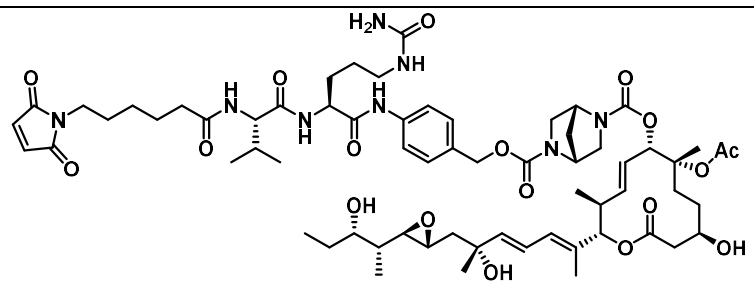
ADL1-D7



Fórmula química: $C_{67}H_{101}N_9O_{18}$

Peso molecular: 1320,59

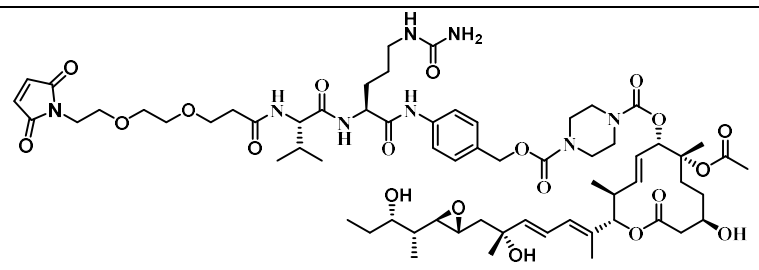
ADL1-D6



Fórmula química: $C_{65}H_{94}N_8O_{18}$

Peso molecular: 1275,51

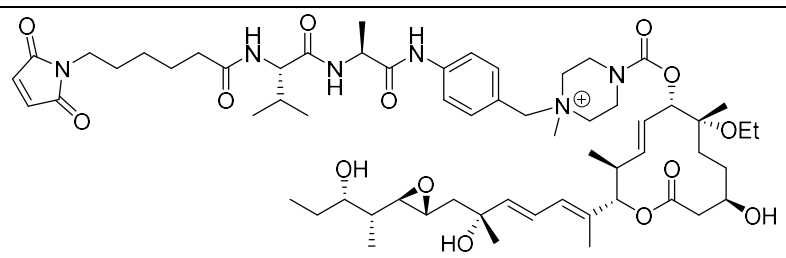
ADL1-D5



Fórmula química: $C_{65}H_{96}N_8O_{20}$

Peso molecular: 1309,52

ADL22-D4

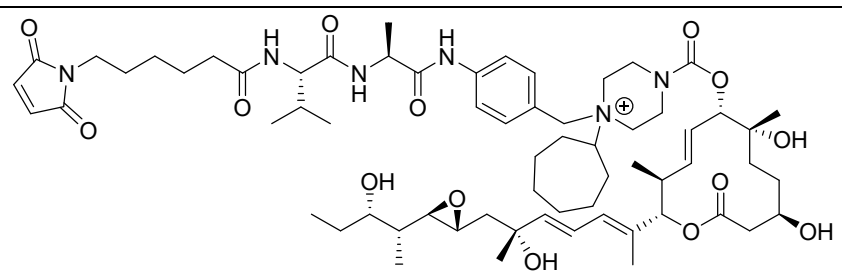


Fórmula química: $C_{61}H_{93}N_6O_{14}^{+}$

Masa exacta: 1133,67

Peso molecular: 1134,44

ADL5-D10

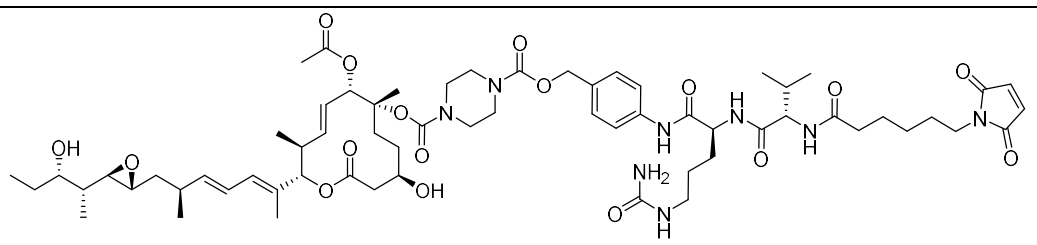


Fórmula química:$C_{65}H_{99}N_6O_{14}^{+}$

Masa exacta: 1187,72

Peso molecular: 1188,53

ADL5-D11

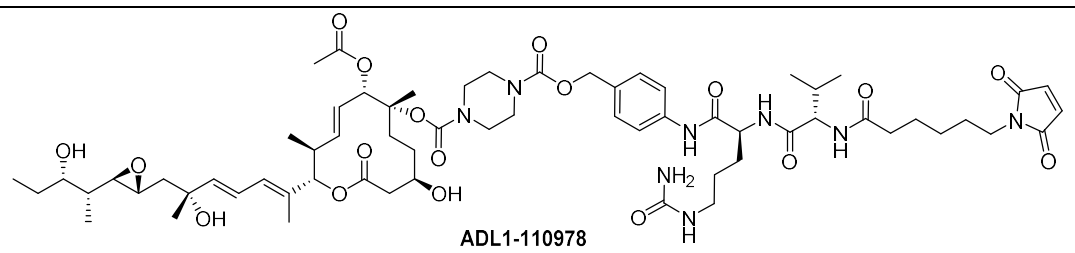


Fórmula química: $C_{64}H_{94}N_8O_{17}$

Masa exacta: 1246,67

Peso molecular: 1247,50

ADL1-D13



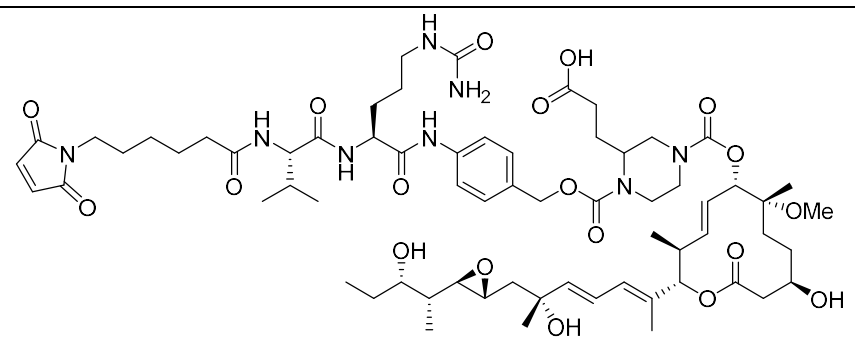
ADL1-110978

Fórmula química: $C_{64}H_{94}N_8O_{18}$

Masa exacta: 1262,67

Peso molecular: 1263,49

ADL1-D8

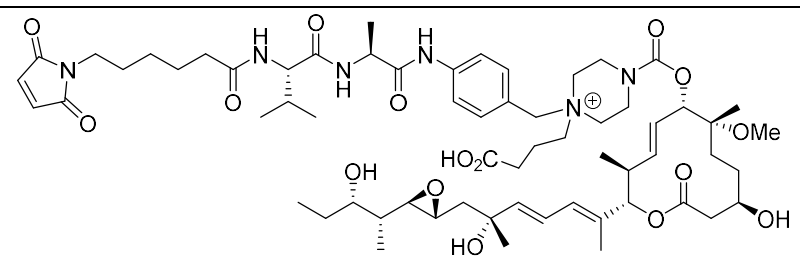


Fórmula química: $C_{66}H_{98}N_8O_{19}$

Masa exacta: 1306,69

Peso molecular: 1307,55

ADL1-D22

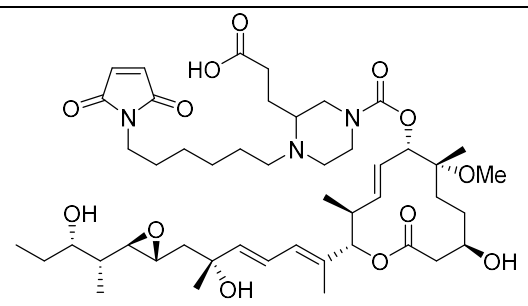


Fórmula química: $C_{63}H_{95}N_6O_{16}^{+}$

Masa exacta: 1191,68

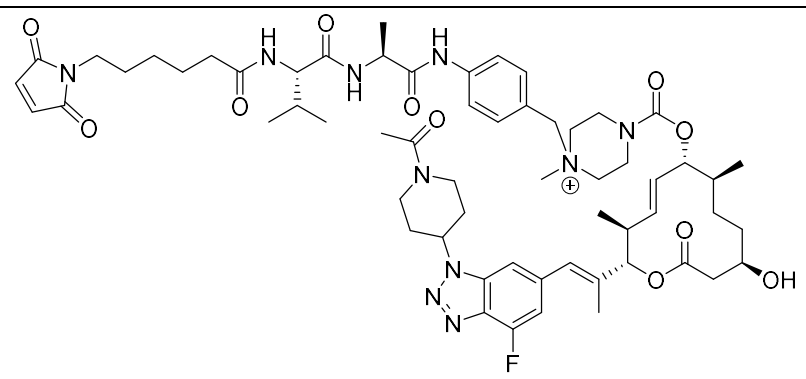
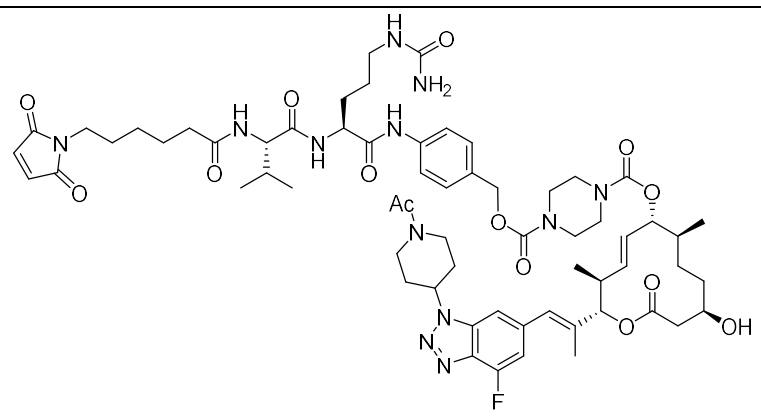
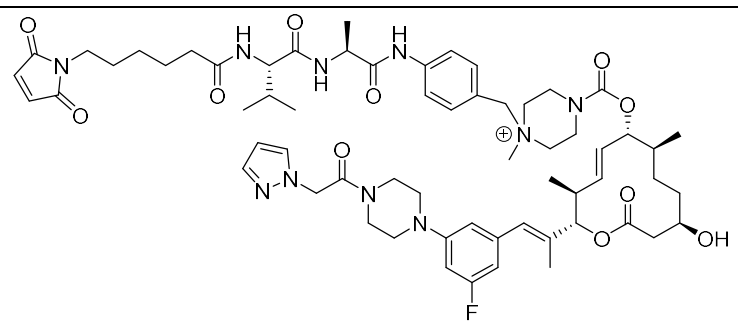
Peso molecular: 1192,48

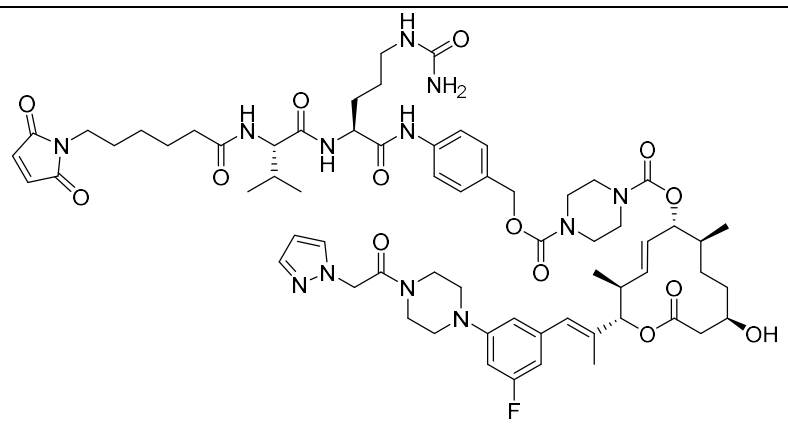
ADL5-D25



Fórmula química: $C_{47}H_{73}N_3O_{13}$

Masa exacta: 887,51

Peso molecular: 888,11 ADL12-D22
 Fórmula química: $C_{60}H_{82}FN_{10}O_{11}^{+}$ Masa exacta: 1137,61 Peso molecular: 1138,37 ADL5-D15
 Fórmula química: $C_{63}H_{85}FN_{12}O_{14}$ Masa exacta: 1252,63 Peso molecular: 1253,44 ADL1-D14
 Fórmula química: $C_{62}H_{84}FN_{10}O_{11}^{+}$ Masa exacta: 1163,63 Peso molecular: 1164,41 ADL5-D26

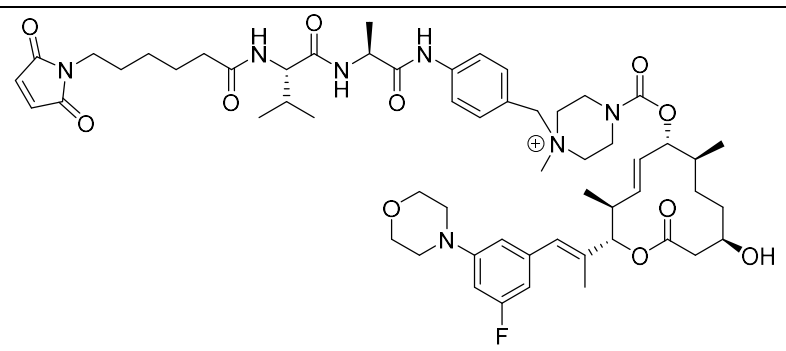


Fórmula química: $C_{65}H_{87}FN_{12}O_{14}$

Masa exacta: 1278,64

Peso molecular: 1279,48

ADL1-D16

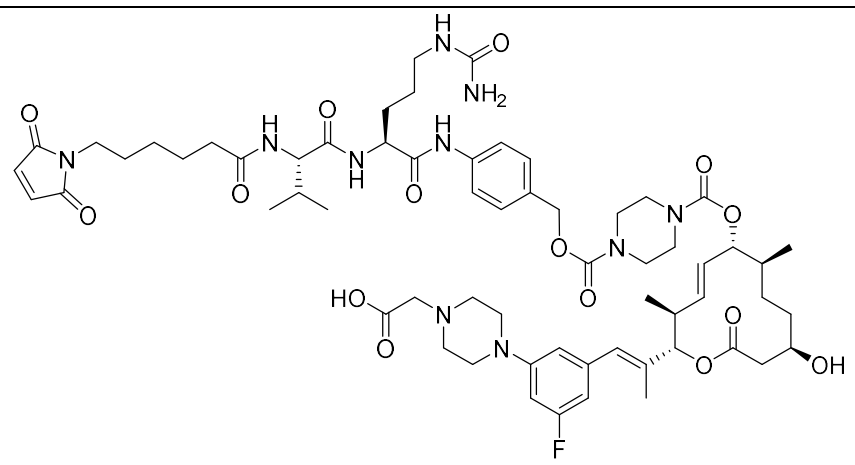


Fórmula química: $C_{57}H_{79}FN_7O_{11}^{+}$

Masa exacta: 1056,58

Peso molecular: 1057,29

ADL5-D17

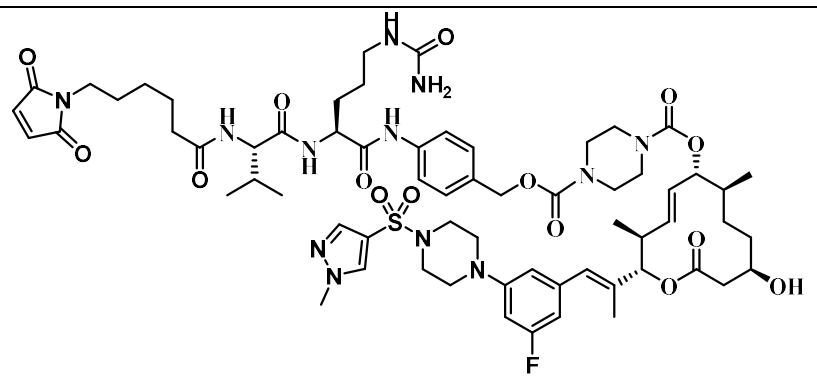


Fórmula química: $C_{62}H_{85}FN_{10}O_{15}$

Masa exacta: 1228,62

Peso molecular: 1229,42

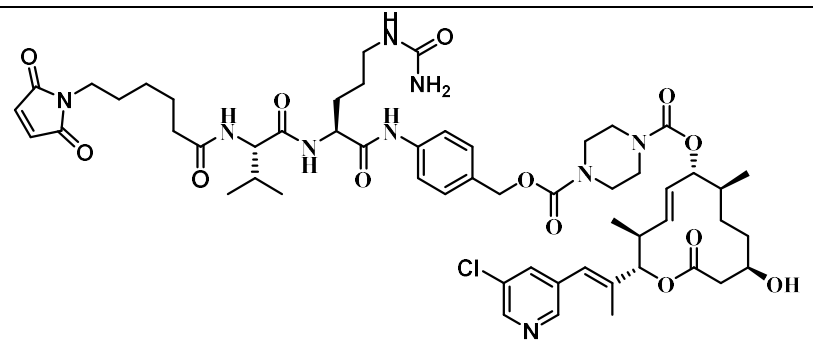
ADL1-D33



Fórmula química: $C_{64}H_{87}FN_{12}O_{15}S$

Peso molecular: 1315,53

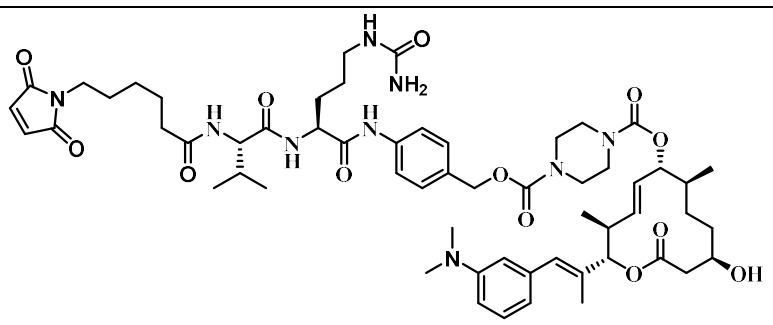
ADL1-D28



Fórmula química: $C_{55}H_{74}ClN_9O_{13}$

Peso molecular: 1104,70

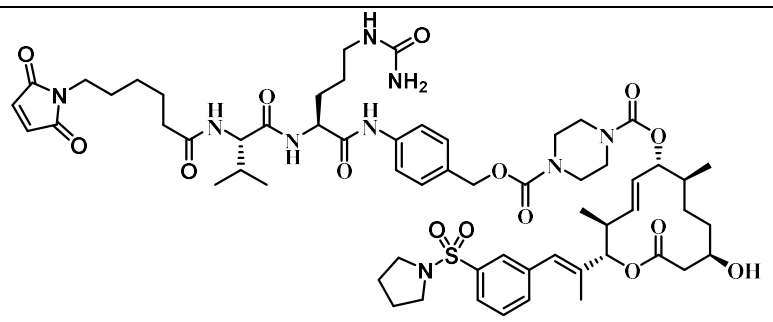
ADL1-D31



Fórmula química: $C_{58}H_{81}N_9O_{13}$

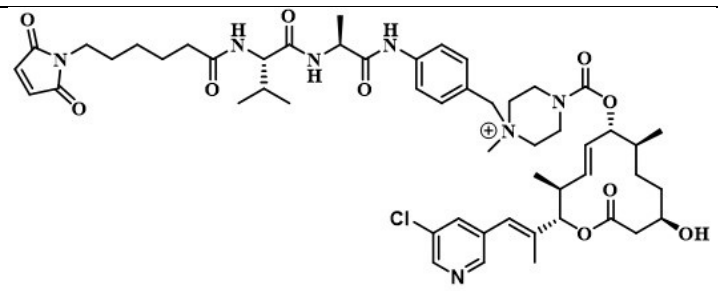
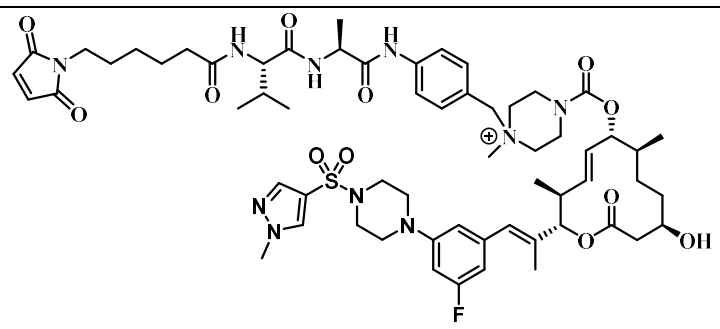
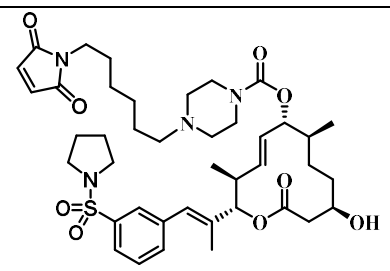
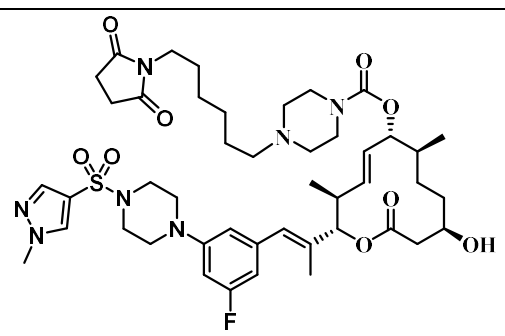
Peso molecular: 1112,34

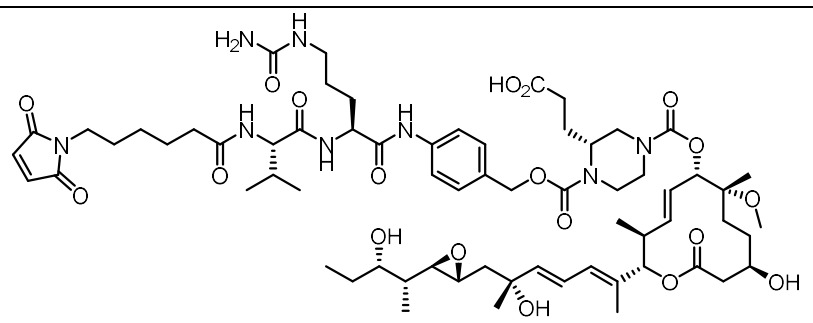
ADL1-D29



Fórmula química: $C_{60}H_{83}N_9O_{15}S$

Peso molecular: 1202,43

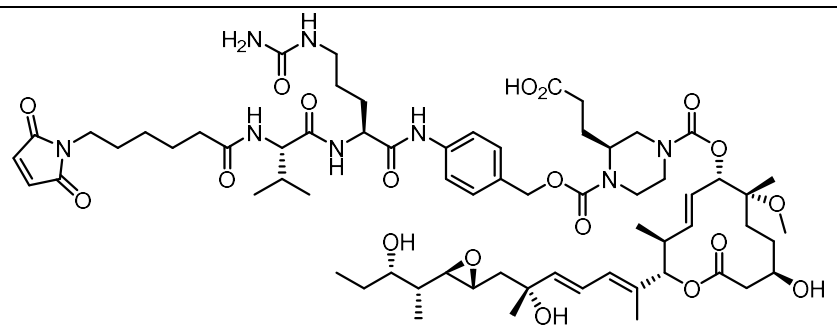
ADL1-D35
 Fórmula química: $C_{52}H_{71}ClN_7O_{10}^+$ Peso molecular: 989,63 ADL5-D32
 Fórmula química: $C_{61}H_{84}FN_{10}O_{12}S^+$ Peso molecular: 1200,46 ADL5-D27
 Fórmula química: $C_{41}H_{58}N_4O_9S$ Peso molecular: 782,99 ADL12-D35
 Fórmula química: $C_{45}H_{64}FN_7O_9S$ Peso molecular: 898,11 ADL12-D28



Fórmula química: $C_{66}H_{98}N_8O_{19}$

Peso molecular: 1307,55

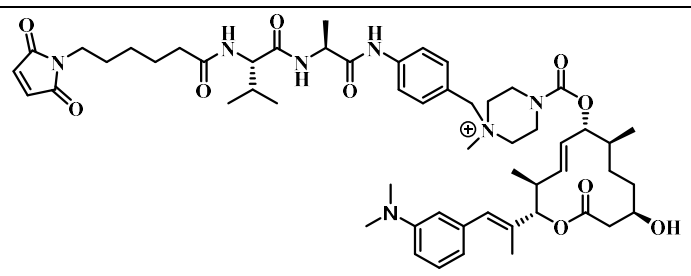
DL1-D23



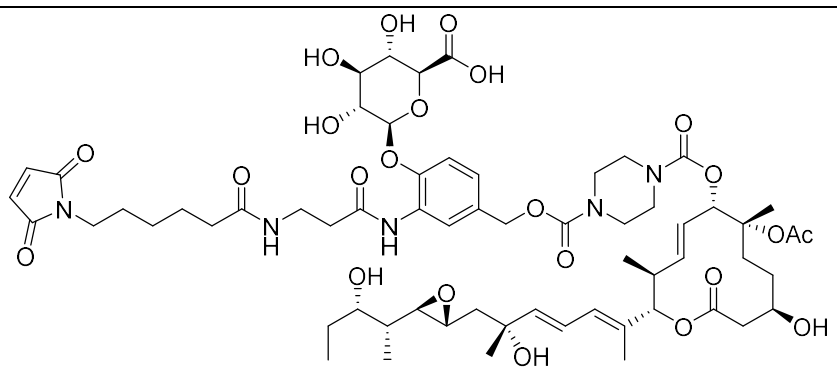
Fórmula química: $C_{66}H_{98}N_8O_{19}$

Peso molecular: 1307,55

ADL1-D24



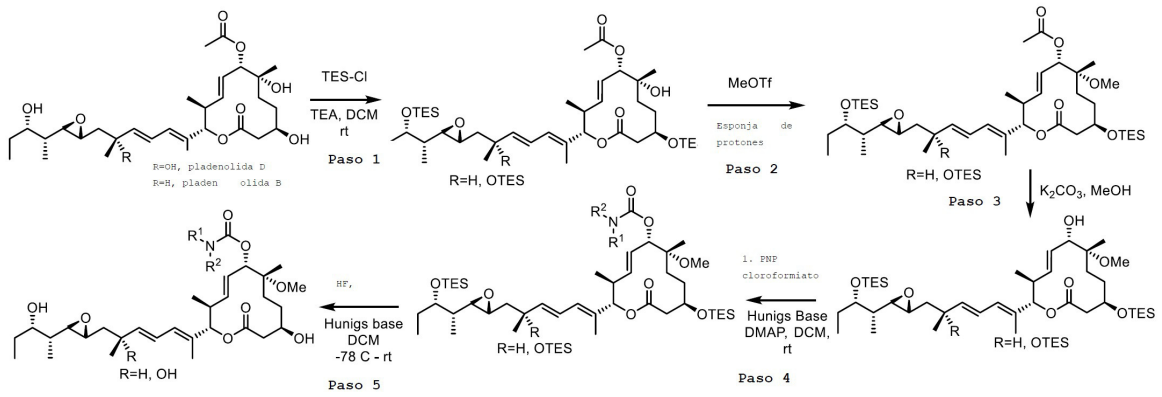
ADL5-D30



ADL13-D4

1.2 Preparación de cargas útiles basadas en pladienolida

1.2.1 Descripción general – Procedimiento general 1



Esquema 1

[0917] Paso 1: Se combinó acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7, 10–dihidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–ilo (1.7 g, 3.154 mmol), trietilamina (4.40 ml, 31.536 mmol) y 1,2–dicloroetano (31.5 ml, 3.154 mmol), y se agitaron a RT. Se agregó clorotrietilsilano (2.1 ml, 12.615 mmol) y se agitó hasta el día siguiente. Se vertió salmuera en la mezcla de reacción y se agitó durante 30 minutos, y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con DCM (3X). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (Na_2SO_4 an.), se concentraron hasta la sequedad y se cromatografiaron para proporcionar acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–hidroxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2S,3S)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–ilo (1.274 g, 1.423 mmol, 45.1 % de rendimiento).

[0918] ^{1}H–RMN (400 MHz, DMSO–*d*6): δ ppm 0.51 – 0.64 (m, 18 H) 0.74 – 0.84 (m, 9 H) 0.90 – 0.97 (m, 26 H) 1.04 (s, 3 H) 1.18 (s, 4 H) 1.37 (s, 3 H) 1.41 – 1.57 (m, 4 H) 1.69 (s, 3 H) 1.84 – 1.93 (m, 1 H) 2.00 – 2.05 (m, 3 H) 2.24 – 2.35 (m, 1 H) 2.38 – 2.45 (m, 1 H) 2.72 – 2.80 (m, 1 H) 3.28 – 3.30 (m, 1 H) 3.62 – 3.70 (m, 1 H) 3.80 – 3.90 (m, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 4.81 – 4.93 (m, 2 H) 5.41 – 5.52 (m, 1 H) 5.63 – 5.73 (m, 1 H) 5.77 – 5.87 (m, 1 H) 6.01 – 6.12 (m, 1 H) 6.42 (dd, J=15.12, 11.11 Hz, 1 H).

[0919] Paso 2: A una solución de acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–hidroxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2S,3S)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–ilo (0.7 g, 0.782 mmol) en tolueno (4.16 ml, 39.085 mmol) se agregó 1,8–naftalenodiamina, N,N,N',N'–tetrametil– (1.173 g, 5.472 mmol), seguida por trifluorometanosulfonato de metilo (0.354 ml, 3.127 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción luego se calentó hasta 50 °C y se calentó durante 3 horas. El solvente se evaporó. La purificación por cromatografía en columna proporcionó acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–metoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2S,3S)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–

oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–ilo (467 mg, 0.513 mmol, 65.7 % de rendimiento) en forma de aceite incoloro.

[0920] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.62 – 0.70 (m, 18 H) 0.83 – 0.95 (m, 13 H) 0.99 – 1.07 (m, 27 H) 1.22 (s, 3 H) 1.24 – 1.36 (m, 2 H), 1.28 – 1.28 (m, 1 H) 1.45 (s, 3 H) 1.47 – 1.65 (m, 8 H) 1.78 (d, J=0.88 Hz, 3 H) 1.91 – 2.00 (m, 1 H) 2.07 (s, 3 H) 2.37 – 2.45 (m, 1 H) 2.51 – 2.68, (m, 3 H) 2.88 – 2.92 (m, 1 H) 3.20 – 3.24 (m, 1 H) 3.35 (s, 3 H) 3.74 – 3.82 (m, 1 H) 3.93 – 4.02 (m, 1 H) 4.94 – 4.99 (m, 1 H) 5.08 – 5.14 (m, 1 H), 5.53 – 5.64 (m, 1 H) 5.70 – 5.79 (m, 1 H) 5.81 – 5.88 (m, 1 H) 6.12 – 6.18 (m, 1 H) 6.47 – 6.58 (m, 1 H).

[0921] Paso 3: Se disolvió acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–hidroxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–ilo (500 mg, 0.558 mmol) en MeOH (6009 µL, 148.524 mmol) y se agregó carbonato de potasio (232 mg, 1.675 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 1 hora y se demostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc (3X). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. La purificación por cromatografía en columna proporcionó (4R,7R,8S,11S,12S,E)–7,8–dihidroxi–7,11–dimetil–12–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–4–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–9–en–2–ona (305 mg, 0.357 mmol, 64.0 % de rendimiento).

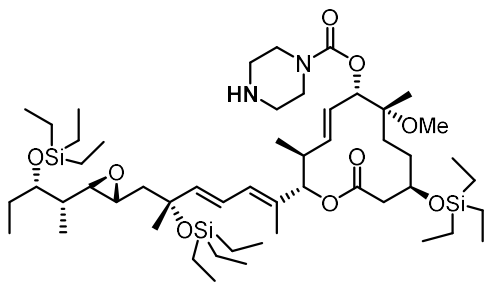
[0922] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.61 – 0.72 (m, 18 H) 0.82 – 0.92 (m, 7 H) 0.92 – 1.06 (m, 30 H) 1.19 – 1.40 (m, 7 H) 1.42 – 1.66 (m, 8 H) 1.51 – 1.52 (m, 1 H) 1.75 – 1.81 (m, 3 H) 1.91 – 2.01 (m, 1 H) 2.34 – 2.45 (m, 1 H) 2.51 – 2.61 (m, 2 H) 2.61 – 2.69 (m, 1 H) 2.86 – 2.94 (m, 1 H) 3.67 – 3.73 (m, 1 H) 3.73 – 3.80 (m, 1 H) 3.89 – 3.96 (m, 1 H) 4.08 – 4.17 (m, 1 H) 4.93 – 4.99 (m, 1 H) 5.36 – 5.47 (m, 1 H) 5.67 – 5.78 (m, 1 H) 5.80 – 5.88 (m, 1 H) 6.10 – 6.19 (m, 1 H) 6.47 – 6.58 (m, 1 H).

[0923] Paso 4: Se combinaron (4R,7R,8S,11S,12S,E)–8–hidroxi–7–metoxi–7,11–dimetil–12–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2S,3S)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–4–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–9–en–2–ona (0.386 g, 0.445 mmol), DCM (0.1 M), DMAP (1.0 equiv.), base de Hunig (5.0 equiv.), cloroformiato de 4–nitrofenilo (1.8 equiv.) y se agitaron hasta el día siguiente. La mezcla de reacción luego se extrajo con 1N NaOH. La capa orgánica se secó (Na_2SO_4 an.) y se concentró hasta la sequedad. El residuo se mezcló con DCM (0.1 M), base de Hunig (5.0 equiv.) y amina (2.0 equiv.), que se combinaron y se agitaron durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró y se cromatografió para proporcionar el carbamato de triTES–pladienolida.

[0924] Paso 5: Se combinaron carbamato de triTES–pladienolida (1 equiv.), DCM (0.04 M) y DIPEA (191 equiv.) y se enfriaron hasta –78 °C. Se agregó fluoruro de hidrógeno–piridina (6.2 equiv.), y la reacción se dejó calentar hasta RT y se agitó hasta el día siguiente. La mezcla de reacción se enfrió en un baño helado, luego se agregó $NaHCO_3$ sat., se agitó, y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 an., se concentraron, y se cromatografiaron para proporcionar el carbamato de pladienolida.

1.2.1.1 D1

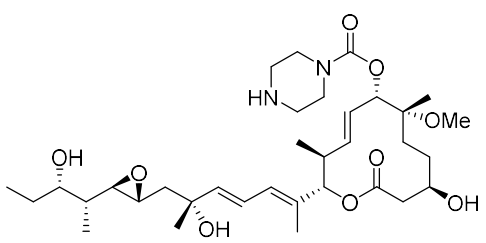
[0925] Se empleó el Procedimiento General 1 (descrito en la sección 1.2.1) para sintetizar D1.



[0926] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–metoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2S,3S)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (240 mg, 0.245 mmol, 55.1 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 980.4 $[M+H]^+$.

[0927] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CDCl_3$–*d*): δ ppm 0.56 – 0.66 (m, 18 H) 0.78 – 0.91 (m, 9 H) 0.96 (t, J=7.91 Hz, 27 H) 1.18 – 1.22 (m, 3 H) 1.23 – 1.28 (m, 1 H) 1.37 – 1.41 (m, 3 H) 1.41 – 1.63 (m, 7 H) 1.69 – 1.74 (m, 3 H) 1.89 (dd, J=13.87, 4.96 Hz, 1 H) 2.33 – 2.62 (m, 4 H) 2.78 – 2.89 (m, 5 H), 3.35 (s, 3 H) 3.43 – 3.52 (m, 4 H) 3.73 (td, J=6.40, 3.51 Hz, 1 H) 3.86 (br dd, J=7.84, 3.95 Hz, 1 H) 4.94 – 5.13 (m, 2 H) 5.58 – 5.76 (m, 3 H) 6.12, (br d, J=0.75 Hz, 1 H) 6.41 (dd, J=15.06, 11.04 Hz, 1 H).

D1



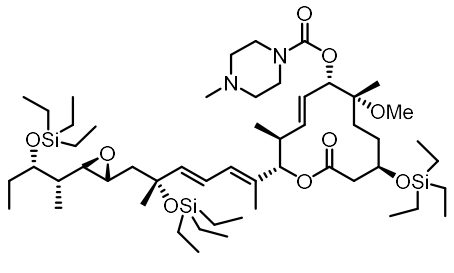
[0928] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-hidroxi-2-((R,2E,4E)-6-hidroxi-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-hidroxipentan-2-yl)oxiran-2-il)-6-metilhepta-2,4-dien-2-il)-7-metoxi-3,7-dimetil-12-oxooxaciclododec-4-en-6-il piperazin-1-carboxylato.

[0929] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.83 – 1.01 (m, 10 H) 1.23 (s, 3 H) 1.25 – 1.32 (m, 1 H) 1.35 (s, 3 H) 1.40 – 1.61 (m, 6 H) 1.61 – 1.71 (m, 2 H) 1.79 (d, J=0.75

Hz, 3 H) 1.84 – 1.93 (m, 1 H) 2.45 – 2.63 (m, 3 H) 2.63 – 2.72 (m, 1 H) 2.77 – 2.85 (m, 4 H) 2.86 – 2.94 (m, 1 H) 3.33 – 3.37 (m, 3 H) 3.40 – 3.57 (m, 5 H) 3.77 – 3.89 (m, 1 H) 4.38 – 4.42 (m, 1 H) 5.01 – 5.12 (m, 2 H) 5.52 – 5.65 (m, 1 H) 5.69 – 5.80 (m, 1 H) 5.84 – 5.92 (m, 1 H) 6.09 – 6.18 (m, 1 H) 6.49 – 6.60 (m, 1 H).

1.2.1.2 D2

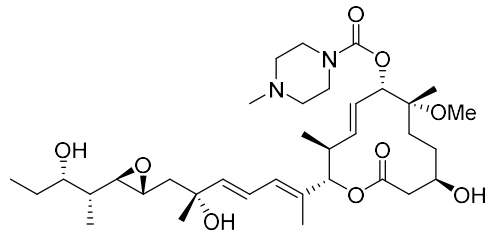
[0930] Se empleó el Procedimiento General 1 (descrito en la sección 1.2.1) para sintetizar D2.



[0931] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–metoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il 4–metilpiperazin–1–carboxilato (413 mg, 0.416 mmol, 90 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 994 $[M+H]^+$.

[0932] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.61 – 0.71 (m, 18 H) 0.83 – 0.94 (m, 9 H) 0.98 – 1.07 (m, 28 H) 1.23 (s, 3 H) 1.41 – 1.48 (m, 3 H) 1.48 – 1.65 (m, 7 H) 1.72 – 1.81 (m, 3 H) 1.93 – 1.99 (m, 1 H) 2.03 (s, 3 H) 2.32 (s, 3 H) 2.38 – 2.48 (m, 5 H) 2.52 – 2.67 (m, 3 H) 2.87 – 2.93 (m, 1 H) 3.47 – 3.61 (m, 4 H) 3.72 – 3.81 (m, 1 H) 3.96 – 4.04 (m, 1 H) 4.53 – 4.62 (m, 1 H) 4.93 – 5.07 (m, 2 H) 5.51 – 5.64 (m, 1 H) 5.69 – 5.79 (m, 1 H) 5.81 – 5.92 (m, 1 H) 6.09 – 6.21 (m, 1 H) 6.46 – 6.60 (m, 1 H).

D2



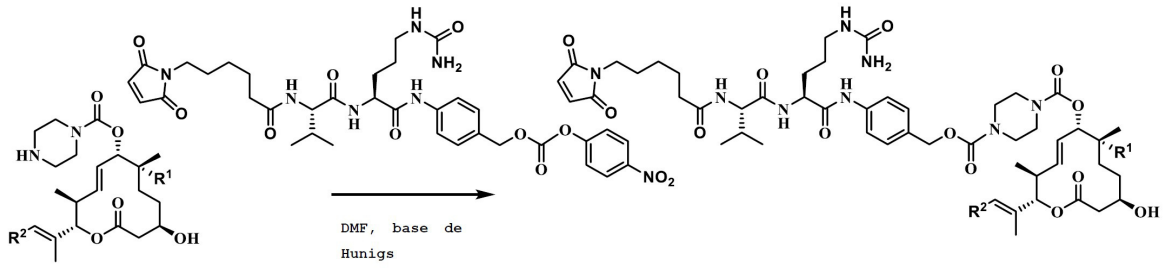
[0933] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–metilpiperazin–1–carboxilato (37.8 mg, 0.058 mmol, 24.05 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 651.69 $[M+H]^+$.

[0934] ^{1}H–RMN (400 MHz, DMSO–*d*6): δ ppm 0.76 – 0.89 (m, 9 H) 1.10 (s, 3 H) 1.20 – 1.26 (m, 3 H) 1.30 – 1.42 (m, 4 H) 1.42 – 1.55 (m, 2 H) 1.66 – 1.75 (m, 3 H) 1.75 – 1.82 (m, 1 H) 2.13 – 2.21 (m, 3 H) 2.25 (br s, 4 H) 2.31 – 2.41 (m, 2 H) 2.54 – 2.60 (m, 2 H) 2.72 – 2.82 (m, 1 H) 3.22 (s, 3 H) 3.36 – 3.40 (m, 3 H) 3.66 – 3.76 (m, 1 H) 4.36 – 4.46 (m, 1 H) 4.53 – 4.60 (m, 1 H) 4.78 – 4.85 (m, 1 H) 4.86 – 4.96 (m, 2 H) 5.36 – 5.50 (m, 1 H) 5.60 –

5.74 (m, 1 H) 5.80 – 5.92 (m, 1 H) 6.02 – 6.11 (m, 1 H) 6.34 – 6.46 (m, 1 H).

1.3 Preparación de enlazador–carga útil de MC–Val–Cit–pABC

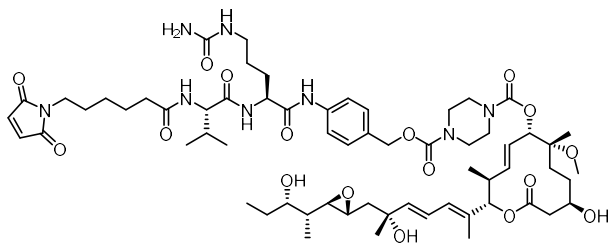
1.3.1 Descripción general – Procedimiento general 1



Esquema 2

[0935] Se combinaron carga útil (1.0 equiv.), base de Hunig (3.0 equiv.), DMF (0.1 M) y (4–nitrofenil)carbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido) bencilo (1.2 equiv.) y se agitaron a RT hasta el día siguiente. La mezcla de reacción luego se concentró y purificó por cromatografía en columna (MeOH en DCM) o HPLC en fase inversa para proporcionar el producto.

1.3.1.1 ADL1–D1

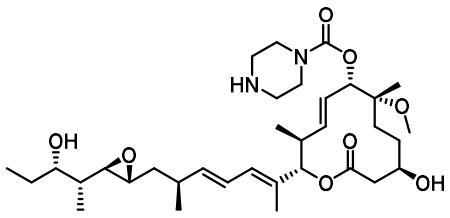


[0936] Enlazador–carga útil (ADL1–D1): Se empleó el Procedimiento General 1 (descrito en la sección 1.3.1) para sintetizar 1–(4–((S)–2–((S)–2–(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) 4–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (50 mg, 0.040 mmol, 42 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1258.5 $[M+Na]^+$.

[0937] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.85 – 1.04 (m, 16 H) 1.18 – 1.26 (m, 3 H) 1.26 – 1.38 (m, 6 H) 1.40 – 1.71 (m, 14 H) 1.80 (s, 3 H) 1.85 – 1.98 (m, 2 H) 2.02 – 2.15 (m, 1 H) 2.24 – 2.34 (m, 2 H) 2.44 – 2.64 (m, 3 H) 2.65 – 2.72 (m, 1 H) 2.87 – 2.96 (m, 1 H) 3.06 –3.27 (m, 2 H) 3.37 (s, 6 H) 3.43 – 3.61 (m, 12 H) 3.79 – 3.90 (m, 1 H) 4.12 – 4.21 (m, 1 H) 4.48 – 4.55 (m, 1 H) 5.02 – 5.14 (m, 4 H) 5.55 – 5.65 (m, 1 H), 5.69 – 5.81 (m, 1 H) 5.85 – 5.93 (m, 1 H) 6.12 – 6.19 (m, 1 H) 6.49 – 6.60 (m, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.29 – 7.38 (m, 2 H) 7.57 – 7.65 (m, 2 H).

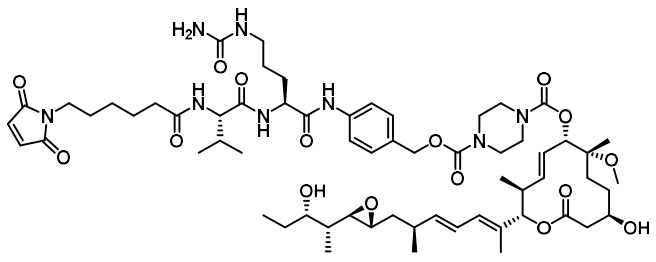
1.3.1.2 ADL1–D18

[0938] La carga útil D18 se preparó usando procedimientos descritos en la sección 1.2.1, empleando pladienolida B como material de partida (SM) (R=H; Esquema 1).



[0939] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((S,2E,4E)–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (205 mg, 0.330 mmol, 77 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 621.6 $[M+H]^+$.

[0940] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.88 – 0.99 (m, 9 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.24 (s, 4 H) 1.42 – 1.69 (m, 8 H) 1.77 (d, *J*=0.88 Hz, 3 H) 2.43 – 2.63 (m, 4 H) 2.64 – 2.70 (m, 1 H) 2.71 – 2.82 (m, 5 H) 3.34 (br s, 3 H) 3.37 (s, 2 H) 3.42 – 3.57 (m, 5 H) 3.79 – 3.89 (m, 1 H) 5.06 (s, 2 H), 5.54 – 5.63 (m, 1 H) 5.64 – 5.80 (m, 2 H) 6.07 – 6.16 (m, 1 H) 6.29 – 6.40 (m, 1 H).



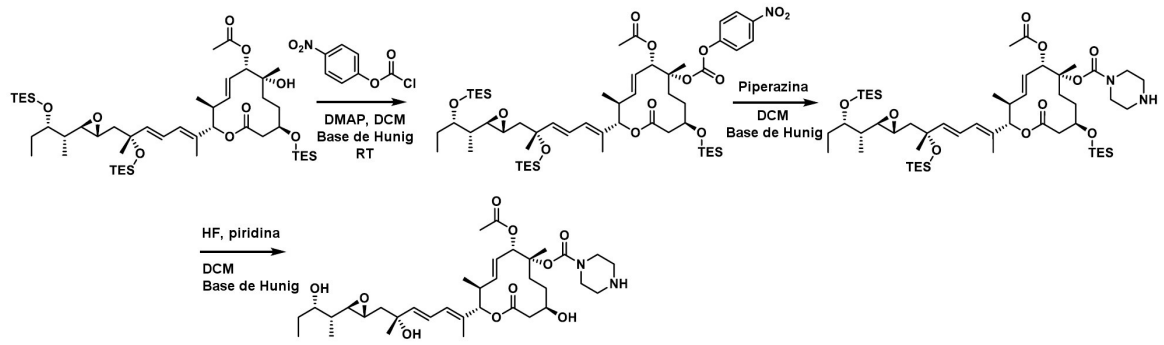
[0941] Enlazador–carga útil (ADL1–D18): Se empleó el Procedimiento General 1 (descrito en la sección 1.3.1) para sintetizar 1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) 4–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((S,2E,4E)–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (72 mg, 0.059 mmol, 54.7 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1220.08 $[M+H]^+$.

[0942] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.87 – 1.02 (m, 15 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.23 (s, 4 H) 1.29 – 1.38 (m, 2 H) 1.44 – 1.68 (m, 13 H), 1.54 – 1.55 (m, 1 H) 1.77 (d, *J*=0.75 Hz, 4 H) 1.87 – 1.95 (m, 1 H) 2.05 – 2.15 (m, 1 H) 2.24 – 2.32 (m, 2 H) 2.45 – 2.62 (m, 4 H) 2.65 – 2.70 (m, 1 H), 2.71 – 2.78 (m, 1 H) 3.13 – 3.18 (m, 2 H) 3.46 – 3.58 (m, 11 H) 3.79 – 3.90 (m, 1 H) 4.13 – 4.21 (m, 1 H) 4.47 – 4.56 (m, 1 H) 5.11 (s, 4 H) 5.53 – 5.81 (m, 3 H) 6.06 – 6.16 (m, 1 H) 6.29 – 6.40 (m, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.34 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H) 7.60 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H).

1.3.1.3 ADL1–D8 y ADL6–D8

[0943] La carga útil se sintetizó de acuerdo con el procedimiento descrito a

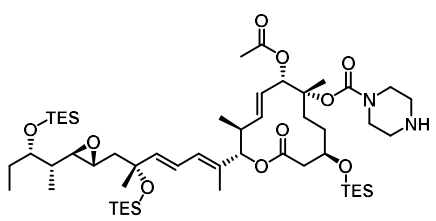
continuación.



Esquema 3

[0944] Paso 1: A una solución de tri–TES–pladienolida D (200 mg, 0.223 mmol) en diclorometano (2 ml) a 0 °C se agregó DMAP (409 mg, 3.35 mmol) y cloroformiato de 4–nitrofenilo (338 mg, 1.675 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 7 días, se diluyó con EtOAc y agua, entonces las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2X), y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron al vacío. La cromatografía flash proporcionó acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–7–(((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–ilo (170 mg, 72 % de rendimiento).

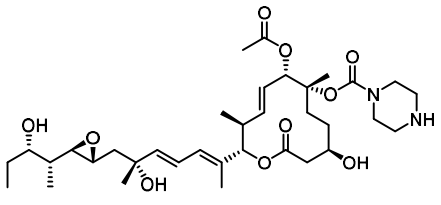
[0945] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.54 – 0.67 (m, 18 H) 0.78 – 1.03 (m, 36 H) 1.19 – 1.32 (m, 1 H) 1.39 (s, 3 H) 1.43 – 1.52 (m, 3 H) 1.55 – 1.63 (m, 3 H) 1.64 (s, 3 H) 1.74 (s, 3 H) 1.88 (dd, *J*=13.80, 5.02 Hz, 1 H) 2.13 (s, 3 H) 2.23 – 2.37 (m, 1 H) 2.39 – 2.48 (m, 2 H) 2.51 – 2.63 (m, 2 H) 2.84 (s, 1 H) 3.69 – 3.77 (m, 1 H) 3.82 – 4.00 (m, 1 H) 5.04 (d, *J*=10.79 Hz, 1 H) 5.24 (d, *J*=9.03 Hz, 1 H) 5.67 – 5.84 (m, 3 H) 6.12 (d, *J*=10.16 Hz, 1 H) 6.42 (dd, *J*=15.06, 11.04 Hz, 1 H) 7.42 (d, *J*=9.29 Hz, 2 H) 8.29 (d, *J*=9.16 Hz, 2 H).



[0946] Paso 2: A una solución de acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–7–(((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–ilo (100 mg, 0.094 mmol) en DCM se agregó piperazina y DMAP. La suspensión amarillenta resultante se agitó durante 6 horas. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar el producto en bruto. La cromatografía flash proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–

il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–7–il piperazin–1–carboxilato (95 mg, 100 %). LC/MS (ESI, m/z), 1008.8 $[M+H]^+$.

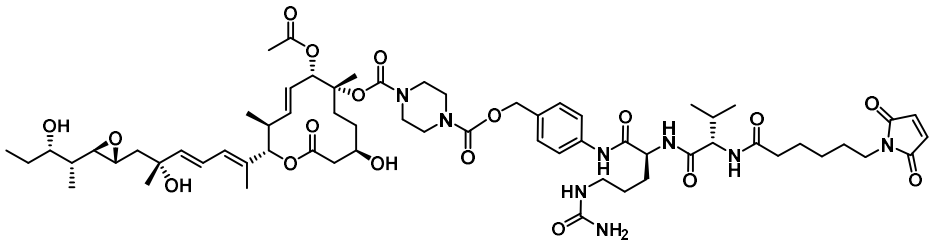
[0947] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.42 – 0.70 (m, 22 H) 0.79 – 0.84 (m, 7 H) 0.86 – 0.91 (m, 4 H) 0.92 – 1.03 (m, 30 H) 1.15 – 1.30 (m, 2 H) 1.37 – 1.42 (m, 3 H) 1.44 – 1.52 (m, 3 H) 1.56 – 1.62 (m, 2 H) 1.62 – 1.68 (m, 1 H) 1.71 – 1.76 (m, 3 H) 1.83 – 1.93 (m, 1 H) 2.03 – 2.11 (m, 4 H) 2.36 – 2.45 (m, 2 H) 2.45 – 2.53 (m, 2 H) 2.54 – 2.64 (m, 1 H) 2.78 – 2.86 (m, 1 H) 2.86 – 3.07 (m, 4 H) 3.32 – 3.45 (m, 1 H) 3.45 – 3.64 (m, 3 H) 3.69 – 3.78 (m, 1 H) 3.79 – 3.94 (m, 1 H) 5.00 (d, *J*=10.54 Hz, 1 H) 5.18 (s, 1 H) 5.54 – 5.79 (m, 3 H) 5.98 – 6.21 (m, 1 H) 6.33 – 6.57 (m, 1 H) 6.84 – 6.96 (m, 3 H) 8.02 – 8.35 (m, 2 H) 8.06 – 8.08 (m, 1 H).



[0948] Paso 3: A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–7–il piperazin–1–carboxilato (95 mg, 0.094 mmol) en THF (3 ml) se agregó TBAF (0.424 ml, 1 M, 0.424 mmol) y se agitó a RT durante 10 horas. La mezcla se concentró y se diluyó con EtOAc, se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se separó y se secó con Na_2SO_4, se filtró, y se concentró al vacío. La purificación por HPLC proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–7–il piperazin–1–carboxilato (16 mg, 26%). LC/MS (ESI, m/z), 665.6 $[M+H]^+$.

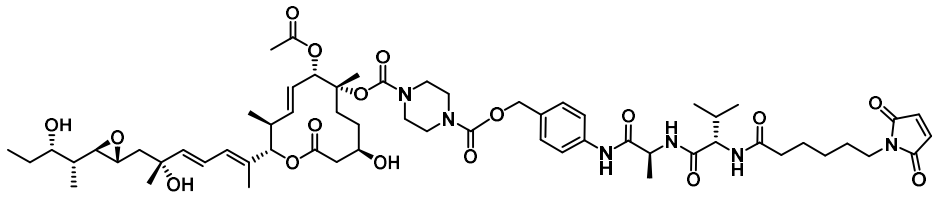
[0949] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.90 (dd, *J*=6.84, 2.20 Hz, 6 H) 0.94 (t, *J*=7.40 Hz, 3 H) 1.20 – 1.30 (m, 1 H) 1.34 (s, 3 H) 1.39 – 1.54 (m, 3 H) 1.55 (s, 3 H) 1.59 – 1.73 (m, 3 H) 1.78 (d, *J*=0.88 Hz, 3 H) 1.86 (dd, *J*=13.99, 5.46 Hz, 1 H) 2.05 (s, 3 H) 2.39 – 2.53 (m, 3 H) 2.55 – 2.65 (m, 1 H) 2.67 (dd, *J*=8.03, 2.26 Hz, 1 H) 2.89 (s, 1 H) 3.22 (br s, 4 H) 3.50 – 3.57 (m, 1 H) 3.58 – 3.90 (m, 5 H) 5.08 (d, *J*=10.67 Hz, 1 H) 5.18 (d, *J*=9.03 Hz, 1 H) 5.58 – 5.78 (m, 2 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.10 – 6.23 (m, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.25, 10.98 Hz, 1 H).

[0950] Paso 4:



[0951] Enlazador–carga útil (ADL1–D8): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (7.5 mg, 10.166 µmol) en DMF (315 µL, 4.066 mmol) se le agregó base de Hunig (5.33 µL, 0.03 mmol). La reacción se enfrió hasta 0 °C y se le agregó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–7–il piperazin–1–carboxilato (7.50 mg, 0.011 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT hasta que se consumió el material inicial. La mezcla de reacción se concentró al vacío. La cromatografía flash proporcionó ADL1–D8 (7.2 mg, 5.70 µmol, 56.1 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$. También se puede emplear el Procedimiento General 1 (1.3.1) para la preparación de ADL1–110987.

[0952] ^{1}H–RMN (400 MHz, CLOROFORM–*d*): δ ppm 0.80 – 1.02 (m, 16 H) 1.20 – 1.35 (m, 6 H) 1.38 – 1.48 (m, 2 H) 1.57 – 1.69 (m, 7 H) 1.74 – 1.81 (m, 4 H) 1.86 – 1.96 (m, 2 H) 2.00 – 2.11 (m, 4 H) 2.31 (br d, *J*=6.02 Hz, 2 H) 2.45 – 2.55 (m, 2 H) 2.59 – 2.74 (m, 2 H) 2.85 – 2.96 (m, 1 H) 3.05 – 3.25 (m, 5 H) 3.40 – 3.59 (m, 9 H) 3.62 – 3.88 (m, 1 H) 4.15 (d, *J*=7.53 Hz, 1 H) 5.05 – 5.22 (m, 5 H) 5.56 – 5.77 (m, 2 H) 5.84 – 5.98 (m, 1 H) 6.11 – 6.22 (m, 1 H) 6.47 – 6.61 (m, 1 H) 7.31 – 7.40 (m, 2 H) 7.56 – 7.65 (m, 2 H).



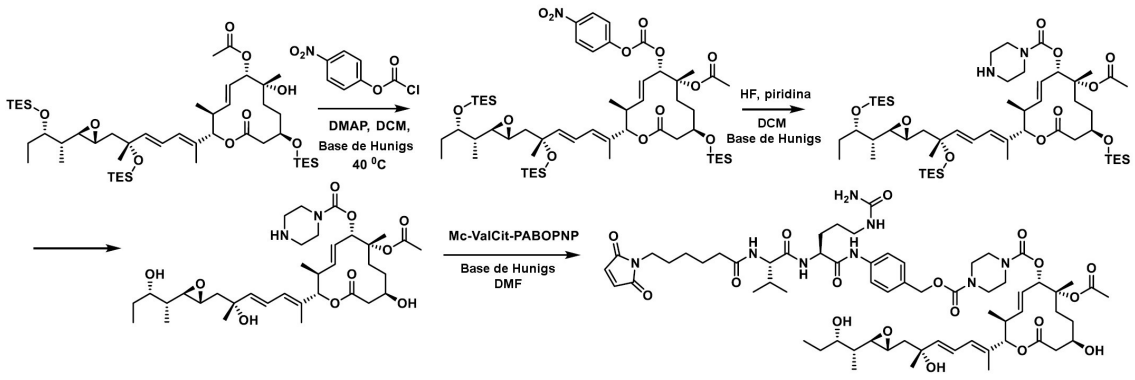
[0953] Enlazador–carga útil (ADL6–D8): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil (4–nitrofenil)carbonato (5 mg, 7.673 µmol) en DMF (238 µL, 3.069 mmol) se le agregó base de Hunig (4.02 µL, .023 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se le agregó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–7–il piperazin–1–carboxilato. La mezcla de reacción se agitó a RT hasta que se consumió el material inicial. La mezcla de reacción se concentró al vacío. Purificación por HPLC ADL6–D8 (1.2 mg, 1.019 µmol, 13.28 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1199.9 $[M+Na]^+$.

[0954] ^{1}H RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.78 – 1.04 (m, 18 H) 1.15 – 1.52 (m, 58 H) 1.64 – 1.72 (m, 3 H) 1.78 (d, *J*=6.53 Hz, 4 H) 2.04 – 2.19 (m, 3 H) 2.21 – 2.30 (m, 1 H) 2.44 – 2.67 (m, 4 H) 2.76 (dd, *J*=6.09, 2.95 Hz, 1 H) 2.90 – 3.02 (m, 1 H) 3.42 – 3.57 (m, 8 H) 3.61 – 3.70 (m, 1 H) 3.77 (br s, 1 H) 4.10 – 4.27 (m, 1 H) 4.58 (br d, *J*=6.65 Hz, 1 H) 5.01 – 5.26 (m, 4 H) 5.52 – 5.70 (m, 2 H) 5.88 (s, 1 H) 5.93 – 6.02 (m, 1 H) 6.08 – 6.18 (m, 1 H)

6.47 – 6.58 (m, 1 H) 7.29 – 7.35 (m, 2 H) 7.55 (d, *J*=8.66 Hz, 1 H).

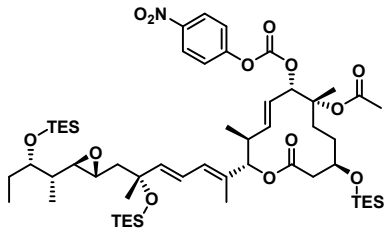
1.3.1.4 ADL1–D4

[0955] ADL1–D4 se sintetizó usando los procedimientos descritos a continuación.



Esquema 4

[0956] Paso 1: Acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–6–(((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–7–ilo

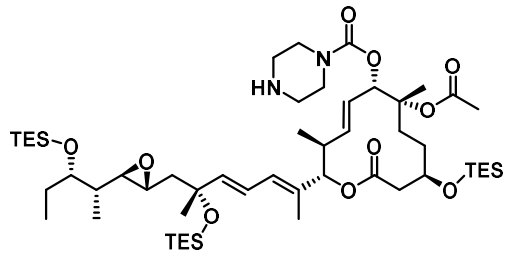


[0957] A una solución de tri–TES pladienolida D (160 mg, 0.179 mmol) en 1,2–dicloroetano (5 ml) a 20 °C se le agregó DMAP (32.7 mg, 0.268 mmol), trietilamina (0.75 ml, 5.36 mmol) y cloroformiato de 4–nitrofenilo (360 mg, 1.787 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 4 días, y a 60 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua, luego las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2X). Los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con agua y salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron, y se concentraron al vacío. La cromatografía flash proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (150 mg, 79 % de rendimiento).

[0958] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.48 – 0.71 (m, 24 H) 0.78 – 0.85 (m, 7 H) 0.86 – 0.93 (m, 5 H) 0.94 – 1.03 (m, 34 H) 1.18 – 1.22 (m, 2 H) 1.22 – 1.26 (m, 2 H) 1.35 – 1.43 (m, 4 H) 1.43 – 1.52 (m, 4 H) 1.54 (s, 4 H) 1.56 – 1.65 (m, 3 H) 1.68 – 1.72 (m, 3 H) 1.75 (br d, *J*=0.75 Hz, 2 H) 1.84 – 1.95 (m, 1 H) 2.01 – 2.06 (m, 2 H) 2.09 (s, 2 H) 2.11 (s, 2 H) 2.33 – 2.52 (m, 4 H) 2.57 (dd, *J*=8.09, 2.07 Hz, 2 H) 2.80 – 2.90 (m, 1 H) 3.66 – 3.80 (m, 1

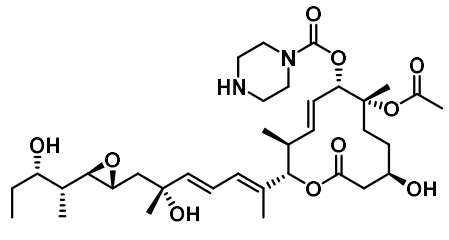
H) 3.82 – 3.93 (m, 2 H) 4.92 – 5.13 (m, 2 H) 5.63 – 5.68 (m, 1 H) 5.69 – 5.74 (m, 1 H) 5.75 – 5.83 (m, 2 H) 6.12 (br d, *J*=10.67 Hz, 1 H) 6.41 (ddd, *J*=15.15, 11.01, 5.08 Hz, 1 H) 7.50 (d, *J*=9.41 Hz, 2 H) 8.35 (d, *J*=9.29 Hz, 2 H).

[0959] Paso 2: (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato



[0960] A una solución de acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–6–(((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–7–ilo en DCM (1 ml) se agregó piperazina (0.447 g, 5.195 mmol) y base de Hunig (0.9 ml, 5.195 mmol). La suspensión amarillenta resultante se agitó durante 6 horas. La mezcla de reacción se concentró y se cromatografió sobre gel de sílice para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (1.0 g, 0.844 mmol, 81 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1008.1 $[M+H]^+$.

D4

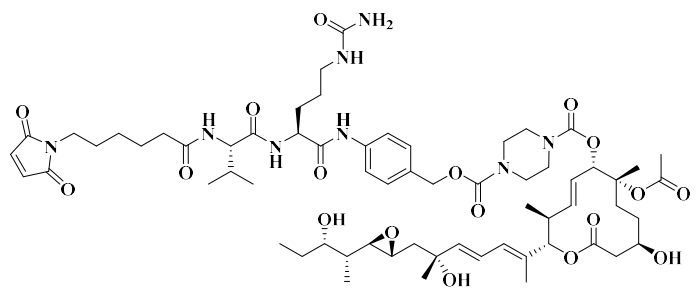


[0961] Paso 3: (2S, 3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2S,3S)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (1.09 g, 0.92 mmol), DCM (20.71 ml, 321.826 mmol) y DIPEA (19.91 ml, 114.018 mmol) se combinaron y se enfriaron hasta –78 °C. Se agregó fluoruro de hidrógeno–piridina (0.518 g, 5.232 mmol), y la reacción se dejó alcanzar RT y se agitó hasta el día siguiente. La LC/MS sugirió desililación. La mezcla de reacción se enfrió en un baño helado. Se agregó $NaHCO_3$ saturado, se agitó y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 an. y se concentraron y

cromatografiaron para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (225 mg, 36.8 %). LC/MS (ESI, m/z), 665.6 $[M+H]^+$.

[0962] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.87 – 0.92 (m, 6 H) 0.94 (t, *J*=7.40 Hz, 3 H) 1.16 – 1.31 (m, 1 H) 1.35 (s, 3 H) 1.40 – 1.56 (m, 4 H) 1.59 (s, 3 H) 1.66 (br dd, *J*=14.68, 7.03 Hz, 3 H) 1.76 – 1.80 (m, 3 H) 1.87 (dd, *J*=14.12, 5.46 Hz, 1 H) 2.05 (s, 3 H) 2.30 – 2.41 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.76 Hz, 2 H) 2.56 – 2.72 (m, 2 H) 2.90 (br d, *J*=2.01 Hz, 1 H) 3.19 (br t, *J*=5.14 Hz, 4 H) 3.50 – 3.59 (m, 1 H) 3.71 (br s, 4 H) 3.77 – 3.89 (m, 1 H) 5.01 – 5.13 (m, 2 H) 5.58 – 5.71 (m, 1 H) 5.71 – 5.81 (m, 1 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.15 (br d, *J*=10.79 Hz, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.18, 10.92 Hz, 1 H).

AD1–D4



[0963] A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (23 mg, 0.031 mmol) en DMF (966 µL) en un matraz de fondo redondo se agregó base de Hunig (16.33 µL, 0.094 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, y se agregó D4 (22.80 mg, 0.034 mmol) y se agitó a RT. La mezcla de reacción se concentró al vacío. La cromatografía flash proporcionó ADL1–D4 (30.5 mg, 0.024 mmol, 77 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$.

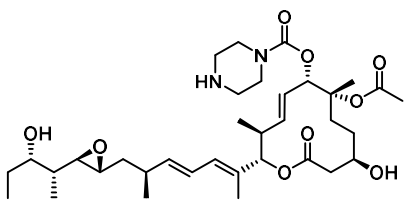
[0964] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.87 – 0.93 (m, 7 H) 0.93 – 1.01 (m, 8 H) 1.19 – 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H) 1.58 – 1.70 (m, 6 H) 1.70 – 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 – 1.95 (m, 2 H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 – 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 – 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 – 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.03 – 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 – 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10 Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 – 5.69 (m, 1 H) 5.72 – 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 – 6.22 (m, 1 H) 6.44 – 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H).

1.3.1.5 ADL1–D9, ADL6–D9 y ADL1–D13

D9 y D13

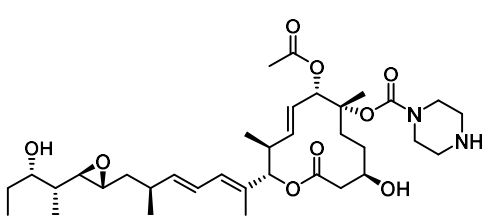
[0965] D9 y D13 se sintetizaron como una mezcla 3:1 de isómeros empleando

procedimientos descritos en la síntesis de D4 (Esquema 4) utilizando tri–TES pladienolida B.



[0966] Carga útil (D9): LC/MS (ESI, m/z), 649.7 $[M+H]^+$.

[0967] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.87 – 1.01 (m, 10 H) 1.08 (d, J=6.78 Hz, 3 H) 1.27 – 1.63 (m, 12 H) 1.66 – 1.74 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.97 – 2.10 (m, 3 H) 2.35 – 2.57 (m, 5 H) 2.58 – 2.65 (m, 1 H) 2.65 – 2.71 (m, 1 H) 2.77 (td, J=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 2.89 – 3.05 (m, 4 H) 3.07 – 3.34 (m, 8 H) 3.50 – 3.68 (m, 5 H) 3.72 – 3.88 (m, 1 H) 4.88 – 5.09 (m, 1 H) 5.18 (d, J=10.67 Hz, 1 H) 5.50 – 5.84 (m, 3 H) 6.01 – 6.13 (m, 1 H) 6.19 – 6.36 (m, 1 H).

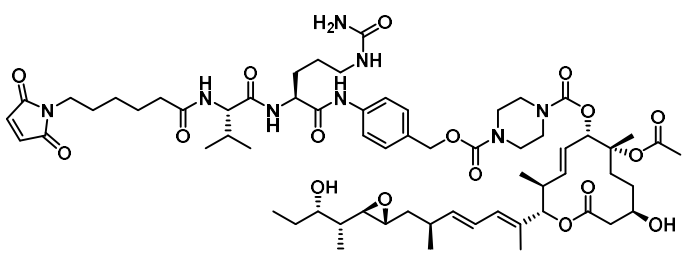


[0968] Carga útil (D13): LC/MS (ESI, m/z), 649.6 $[M+H]^+$.

[0969] ^{1}H RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*) δ ppm 0.84 – 1.01 (m, 11 H) 1.08 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.29 – 1.64 (m, 10 H) 1.63 – 1.73 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.94 – 2.12 (m, 4 H) 2.37 – 2.58 (m, 4 H) 2.59 – 2.65 (m, 1 H) 2.68 (dd, *J*=7.40, 2.26 Hz, 1 H) 2.77 (td, *J*=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 3.01 – 3.30 (m, 4 H) 3.49 (s, 1 H) 3.54 – 3.67 (m, 2 H) 3.69 – 3.92 (m, 5 H) 4.13 – 4.78 (m, 11 H) 5.13 – 5.24 (m, 2 H) 5.48 – 5.61 (m, 1 H) 5.62 – 5.74 (m, 2 H) 6.04 – 6.13 (m, 1 H) 6.18 – 6.32 (m, 1 H).

ADL1–D9

[0970] Se empleó el Procedimiento General 1 (descrito en la sección 1.3.1) para sintetizar ADL1–D9.



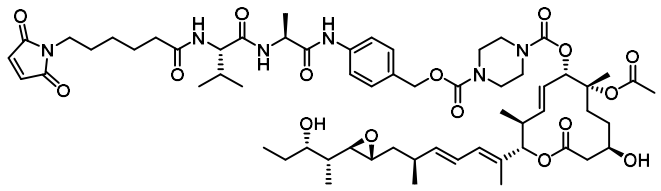
[0971] Enlazador–carga útil (ADL1–D9): (30.5 mg, 0.024 mmol, 77 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$.

[0972] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.87 – 0.93 (m, 7 H) 0.93 – 1.01 (m, 8 H) 1.19 – 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H) 1.58 – 1.70 (m, 6 H) 1.70 – 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 – 1.95 (m, 2 H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 – 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 – 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 – 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1

H) 3.03 – 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 – 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10 Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 – 5.69 (m, 1 H) 5.72 – 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 – 6.22 (m, 1 H) 6.44 – 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H).

ADL6–D9

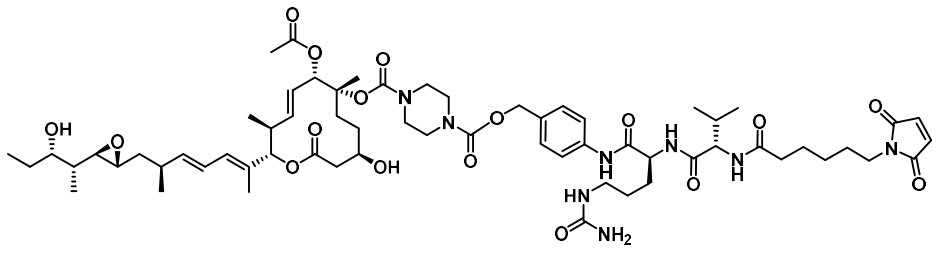
[0973] Se empleó el Procedimiento General 1 (descrito en la sección 1.3.1) para sintetizar ADL6–D9.



[0974] Enlazador–carga útil (ADL6–D9): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato diluido (16.5 mg, 0.025 mmol) en DMF (784 µL) se agregó base de Hunig (13.27 µL, 0.076 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, y se agregó D9. La mezcla de reacción se agitó a RT hasta que la LC/MS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró al vacío. La cromatografía flash del residuo en gel de sílice con DCM/MeOH proporcionó el compuesto del título (16.7 mg, 57% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1184.6 $[M+Na]^+$.

[0975] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.80 – 1.02 (m, 16 H) 1.05 – 1.12 (m, 4 H) 1.13 – 1.34 (m, 5 H) 1.38 – 1.51 (m, 7 H) 1.53 – 1.68 (m, 11 H) 1.71 – 1.80 (m, 4 H) 1.97 – 2.16 (m, 4 H) 2.24 – 2.32 (m, 2 H) 2.32 – 2.42 (m, 1 H) 2.43 – 2.55 (m, 3 H) 2.56 – 2.69 (m, 3 H) 2.73 (br d, *J*=2.13 Hz, 1 H) 3.07 – 3.18 (m, 1 H) 3.42 – 3.61 (m, 17 H) 3.75 – 3.91 (m, 1 H) 4.11 – 4.24 (m, 1 H) 4.43 (s, 2 H) 5.59 – 5.88 (m, 4 H) 6.06 – 6.17 (m, 1 H) 6.29 – 6.39 (m, 1 H) 7.24 – 7.39 (m, 2 H) 7.52 – 7.64 (m, 2 H).

ADL1–D13

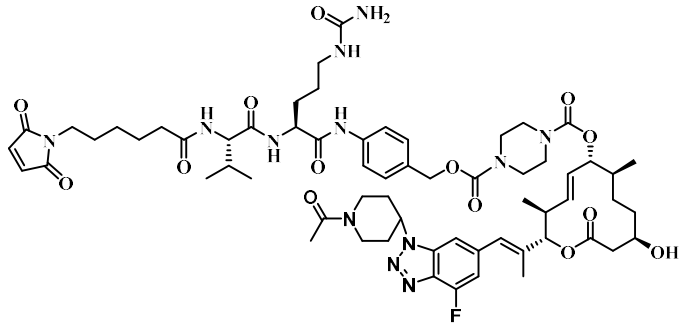


[0976] Enlazador–carga útil (AD1–D13): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (4.2 mg, 5.693 µmol) en DMF (176 µL, 2.277 mmol) se le agregó base de Hunig (2.98 µL, 0.017 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se agregó D13 (4.06 mg, 6.262 µmol). La mezcla de reacción se agitó a RT hasta que la LC/MS

mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró al vacío. La cromatografía flash del residuo en gel de sílice con DCM/MeOH proporcionó el compuesto del título (4.8 mg, 68% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1248.0 $[M+H]^+$.

[0977] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.58 – 0.98 (m, 10 H) 0.99 – 1.06 (m, 2 H) 1.11 – 1.31 (m, 6 H) 1.57 – 1.75 (m, 3 H) 2.11 – 2.26 (m, 1 H) 2.30 – 2.73 (m, 2 H) 3.28 – 3.80 (m, 7 H) 4.14 – 4.33 (m, 1 H) 4.44 – 4.55 (m, 1 H) 4.63 – 4.81 (m, 1 H) 4.92 – 5.06 (m, 1 H) 5.09 (s, 1 H) 5.49 – 5.74 (m, 1 H) 5.88 – 6.09 (m, 1 H) 6.14 – 6.36 (m, 1 H) 6.99 – 7.08 (m, 1 H) 7.21 – 7.38 (m, 2 H) 7.53 – 7.67 (m, 1 H) 7.95 (s, 1 H).

1.3.1.6 ADL1–D14

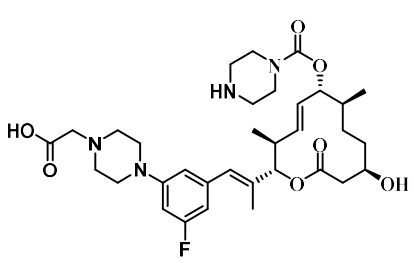


[0978] Se empleó el Procedimiento General 1 (descrito en la sección 1.3.1) para sintetizar 1–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(1–(1–acetilpiperidin–4–il)–4–fluoro–1H–benzo[d][1,2,3]triazol–6–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (30 mg, 0.024 mmol, 39.2 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1254.5 $[M+H]^+$.

[0979] ^{1}H–RMN (400 MHz, DMSO–*d*6): δ ppm 0.75 – 1.00 (m, 12 H), 1.06 – 1.26 (m, 4 H), 1.26 – 1.77 (m, 13 H), 1.75 – 2.02 (m, 7 H), 2.08 (s, 8 H), 2.23 – 2.35 (m, 2 H), 2.54 – 2.70 (m, 2 H), 2.78 – 3.10 (m, 4 H), 3.36 (br s, 13 H), 3.66 – 3.79 (m, 1 H), 3.95 – 4.08 (m, 1 H), 4.11 – 4.25 (m, 1 H), 4.28 – 4.46 (m, 1 H), 4.46 – 4.58 (m, 1 H), 4.58 – 4.66 (m, 1 H), 4.66 – 4.77 (m, 1 H), 5.01 (s, 3 H), 5.14 – 5.27 (m, 1 H), 5.39 (s, 4 H), 5.71 – 5.79 (m, 1 H), 5.87 – 6.00 (m, 1 H), 6.63 – 6.75 (m, 1 H), 6.99 (s, 2 H), 7.13 – 7.24 (m, 1 H), 7.24 – 7.34 (m, 2 H), 7.52 – 7.62 (m, 2 H), 7.65 – 7.74 (m, 1 H), 7.75 – 7.82 (m, 1 H), 7.98 – 8.13 (m, 1 H).

1.3.1.7 ADL1–D33

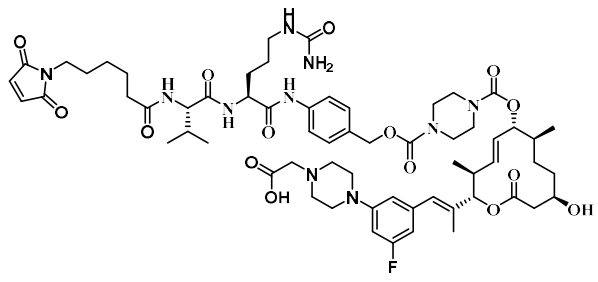
D33



[0980] A una solución agitada de (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–(2–metoxi–2–oxoetil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (27 mg, 0.042 mmol) en THF/H_2O (3 ml/1 ml) a 0 °C se agregó LiOH, y la mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta 25 °C. (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–(2–metoxi–2–oxoetil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato se sintetizó usando procedimientos descritos en la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2019/026992 (véase, por ejemplo, Procedimientos 17 y 19), que se incorpora a la presente por referencia. Al cabo de 6 horas, la mezcla de reacción se neutralizó con tampón de fosfato (NaH_2PO_4, 1.0 M, 3 ml) y las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 2 ml), y las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. La cromatografía en columna en fase inversa proporcionó el compuesto del título (19.4 mg, 0.031 mmol, 73.4 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 631.4 $[M+H]^+$.

[0981] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.85 – 1.16 (m, 2 H) 1.23 – 1.52 (m, 1 H) 1.57 – 1.77 (m, 1 H) 1.87 (s, 1 H) 1.92 – 2.13 (m, 1 H) 2.35 – 2.55 (m, 1 H) 2.50 – 2.74 (m, 1 H) 3.11 (br s, 1 H) 3.36 – 3.54 (m, 2 H) 3.64 (br d, *J*=10.42 Hz, 2 H) 3.77 – 3.90 (m, 1 H) 4.76 (br s, 4 H) 5.07 – 5.19 (m, 1 H) 5.38 – 5.68 (m, 1 H) 6.40 – 6.76 (m, 1 H) 8.02 – 8.66 (m, 1 H).

ADL1–D33



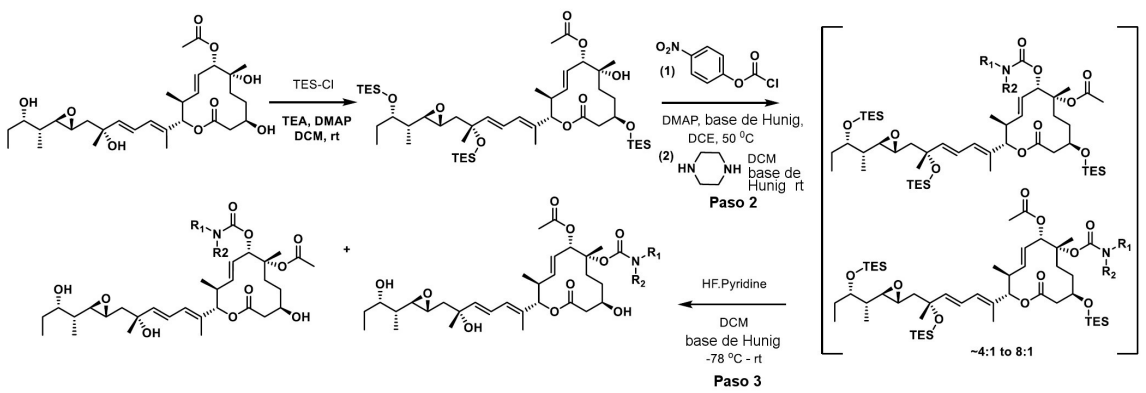
[0982] Enlazador–carga útil (ADL1–D33): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (17 mg, .023 mmol) en DMF (714 µL, 9.217 mmol) se le agregó base de Hunig (12.07 µL, 0.069 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se le agregó ácido 2–(4–(3–fluoro–5–((E)–2–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxo–6–((piperazin–1–carbonil)oxi)oxaciclododec–4–en–2–il)prop–1–en–1–il)fenil)piperazin–1–il)acético (16.71 mg, 0.026 mmol). La mezcla de reacción se agitó a RT hasta que la LC/MS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró al vacío. La cromatografía flash en gel de sílice y la purificación adicional por HPLC proporcionó el compuesto del título (13.5 mg, 10.98 µmol, 47.7 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1229.5 $[M+H]^+$.

[0983] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.92 – 0.99 (m, 10 H) 1.01 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.24 – 1.46 (m, 9 H) 1.52 – 1.70 (m, 10 H) 1.70 – 1.82 (m, 1 H) 1.87 (d, *J*=1.00 Hz, 4 H) 1.89 – 2.00 (m, 2 H) 2.01 – 2.23 (m, 2 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.46 (dd, *J*=14.31, 5.27 Hz, 1 H) 2.57 – 2.71 (m, 2 H) 2.86 (d, *J*=0.63 Hz, 1 H) 3.00 (s, 1 H) 3.06 – 3.27 (m, 4 H) 3.35 (s, 5 H) 3.41 – 3.53 (m, 19 H) 3.66 (s, 2 H) 3.76 – 3.90 (m, 1 H) 4.07 – 4.21 (m, 1 H) 4.39 – 4.69 (m, 37 H) 5.09 (s, 3 H) 5.13 (d, *J*=10.54 Hz, 1 H) 5.52 (dd, *J*=14.56, 9.03 Hz, 2 H) 6.55 (br s, 2 H) 6.69 (d, *J*=1.38 Hz, 2 H) 7.33 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.59 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H) 7.88 – 8.04 (m, 1 H) 8.16 – 8.33 (m, 1 H).

1.3.2 ADL1–D4, ADL1–D5, ADL21–D4, ADL22–D4, ADL23–D4, ADL13–D4

1.3.2.1 Procedimiento general para la preparación de D4 y D5

[0984] El procedimiento de 4 pasos descrito a continuación se empleó para sintetizar los compuestos del título.



Paso 2

[0985] A una solución de tri–TES Pladenolida D (1.0 equiv.) en 1,2–dicloroetano (0.2 M) a 20 °C se agregó DMAP (1.5 equiv.), trietilamina (30 equiv.) y cloroformiato de 4–nitrofenilo (10 equiv.). La mezcla se agitó a 40 °C durante 4 días, y luego durante 2 h a 60 °C. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua, luego las capas se separaron, y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc en hexano) para proporcionar el carbonato intermediario. El carbonato (1.0 equiv.), DCM (0.2M), trietilamina (3.0 equiv.) y amina (2.0 equiv.) se combinaron y se agitaron a rt durante 1 hora. La mezcla resultante se concentró al vacío y se cromatografió (DCM / MeOH) para proporcionar el intermediario de carbamato como mezcla de regioisómeros.

Paso 3

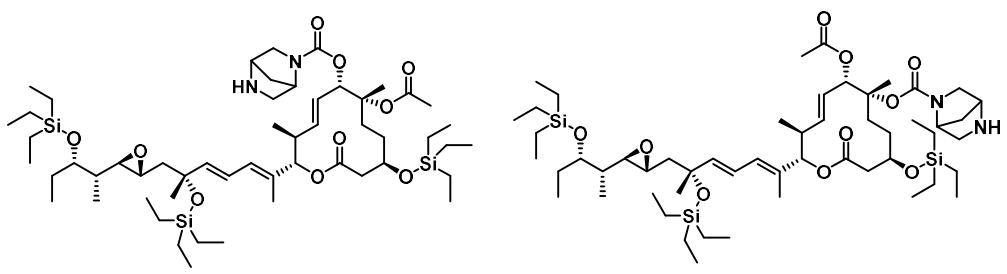
[0986] La mezcla de carbamatos regioisoméricos obtenida en el Paso 2 (1.0 equiv.) se disolvió en DCM (0.04 M). Se agregó base de Hunig (124 equiv.), y la mezcla resultante

se enfrió hasta –78 ˚C. Se agregó HF·piridina (30 equiv.) por goteo, y la mezcla se calentó hasta rt y se agitó hasta el día siguiente a rt. La mezcla luego se enfrió hasta –78 ˚C y se agregó bicarbonato de sodio saturado por goteo a la mezcla de reacción y la mezcla se calentó hasta rt. Las capas orgánicas se particionaron, y la capa acuosa se extrajo con DCM (3X). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron, y se concentraron al vacío. El residuo resultante se sometió a purificación por HPLC en fase inversa para proporcionar cada uno de los productos regioisoméricos deseados.

D5

[0987] El compuesto del título se preparó usando 2,5–diazabiciclo[2.2.1]heptano en el paso 2 a través del procedimiento general 1.3.2.1, pasos 2 y 3.

Paso 2

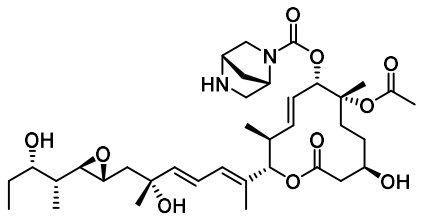


[0988] Se obtuvo una mezcla de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il 2,5–diazabiciclo[2.2.1]heptano–2–carboxilato y (2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–7–il 2,5–diazabiciclo[2.2.1]heptano–2–carboxilato (21.7 mg, 45.1%) en forma de aceite incoloro. LCMS (ESI, m/z), $[M+H]^+$ 1020.6

[0989] ^{1}H RMN (400 MHz, METANOL–d) δ ppm 0.61 – 0.70 (m, 19 H) 0.82 – 0.95 (m, 10 H) 0.95 – 1.04 (m, 29 H) 1.23 (br dd, J=7.15, 4.64 Hz, 1 H)1.30 (s, 1 H) 1.42 – 1.64 (m, 12 H) 1.78 (s, 4 H) 1.88 – 2.01 (m, 2 H) 2.06 (br d, J=10.92 Hz, 3 H) 2.14 (br s, 1 H) 2.43 (br d, J=4.64 Hz, 2 H) 2.49 (br s, 1 H) 2.63 (dd, J=8.16, 2.13 Hz, 2 H) 2.86 – 2.91 (m, 1 H) 3.47 – 3.66 (m, 2 H) 3.76 (td, J=6.37, 3.33 Hz, 1 H) 3.95 (br d, J=4.27 Hz, 1 H) 4.34 (br s, 1H) 6.15 (br d, J=10.92 Hz, 1 H) 6.52 (dd, J=15.12, 10.98 Hz, 1H)

Paso 3

D5



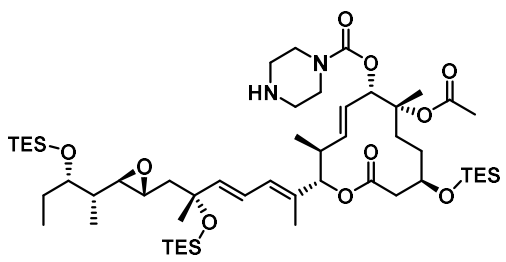
[0990] La purificación por HPLC proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il (1S,4S)–2,5–diazabiciclo[2.2.1]heptano–2–carboxilato (5 mg, 34.7%) en forma de sólido blanco. LCMS (ESI, m/z), $[M+H]^+$ 677.6

[0991] 1H RMN (400 MHz, METANOL–*d*4) δ ppm 0.85 – 0.98 (m, 9 H) 1.25 (td, *J*=7.40, 4.14 Hz, 1 H) 1.34 (s, 3 H) 1.42 – 1.69 (m, 9 H) 1.79 (s, 4 H) 1.82 – 1.96 (m, 2 H) 2.04 (d, *J*=9.29 Hz, 3 H) 2.33 (br d, *J*=10.04 Hz, 1 H) 2.47 – 2.54 (m, 2 H) 2.57 – 2.72 (m, 2 H) 2.87 – 2.92 (m, 1 H) 3.03 (br s,2 H) 3.33 – 3.43 (m, 2 H) 3.43 – 3.57 (m, 2 H) 3.77 – 3.84 (m, 1 H) 3.86 – 3.94 (m, 1 H) 4.50 (br s, 1 H) 4.97 – 5.11 (m, 2 H) 5.60 – 5.68 (m, 1 H) 5.73 – 5.82 (m, 1 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.15 (br d, *J*=11.04 Hz, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.25, 10.98 Hz, 1 H) 8.54 (s, 1 H)

D4

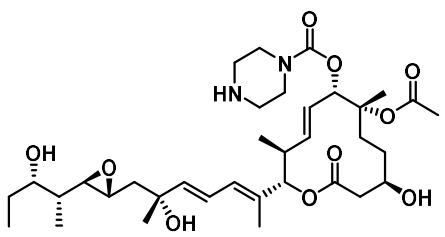
[0992] El compuesto del título se preparó usando piperazina en el paso 2 a través del procedimiento general **1.3.2.1** pasos 2 y 3

Paso 2:



[0993] El procedimiento general 1.3.2.1, paso 2 empleando piperazina proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (1.0 g, 0.844 mmol, 81% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1008.1 $[M+H]^+$.

Paso 3: **D4**

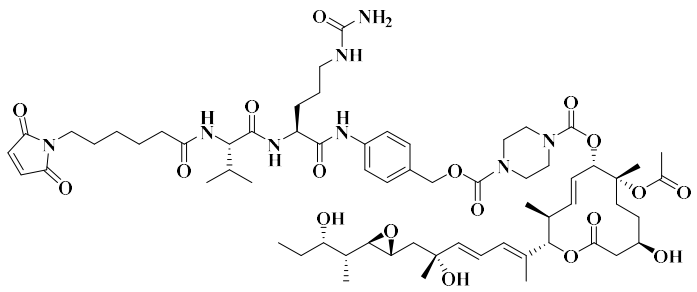


[0994] La purificación por HPLC proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–

hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (225 mg, 36.8 %). LC/MS (ESI, m/z), 665.6 $[M+H]^+$.

[0995] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.87 – 0.92 (m, 6 H) 0.94 (t, *J*=7.40 Hz, 3 H) 1.16 – 1.31 (m, 1 H) 1.35 (s, 3 H) 1.40 – 1.56 (m, 4 H) 1.59 (s, 3 H) 1.66 (br dd, *J*=14.68, 7.03 Hz, 3 H) 1.76 – 1.80 (m, 3 H) 1.87 (dd, *J*=14.12, 5.46 Hz, 1 H) 2.05 (s, 3 H) 2.30 – 2.41 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.76 Hz, 2 H) 2.56 – 2.72 (m, 2 H) 2.90 (br d, *J*=2.01 Hz, 1 H) 3.19 (br t, *J*=5.14 Hz, 4 H) 3.50 – 3.59 (m, 1 H) 3.71 (br s, 4 H) 3.77 – 3.89 (m, 1 H) 5.01 – 5.13 (m, 2 H) 5.58 – 5.71 (m, 1 H) 5.71 – 5.81 (m, 1 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.15 (br d, *J*=10.79 Hz, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.18, 10.92 Hz, 1 H).

ADL1–D4

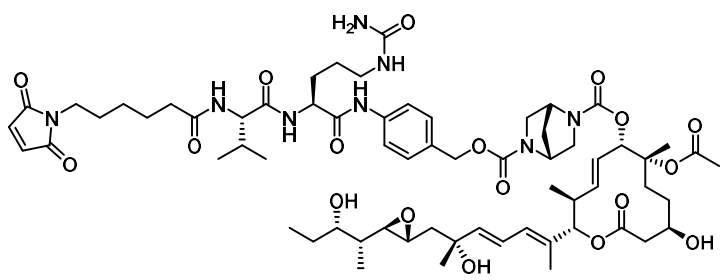


[0996] El procedimiento general 1 (1.3.1) se empleó para la preparación de ADL1–D4. La cromatografía flash proporcionó ADL1–D4 (30.5 mg, 0.024 mmol, 77 % de rendimiento).

[0997] LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$.

[0998] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.87 – 0.93 (m, 7 H) 0.93 – 1.01 (m, 8 H) 1.19 – 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H) 1.58 – 1.70 (m, 6 H) 1.70 – 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 – 1.95 (m, 2 H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 – 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 – 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 – 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.03 – 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 – 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10 Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 – 5.69 (m, 1 H) 5.72 – 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 – 6.22 (m, 1 H) 6.44 – 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H).

ADL1–D5

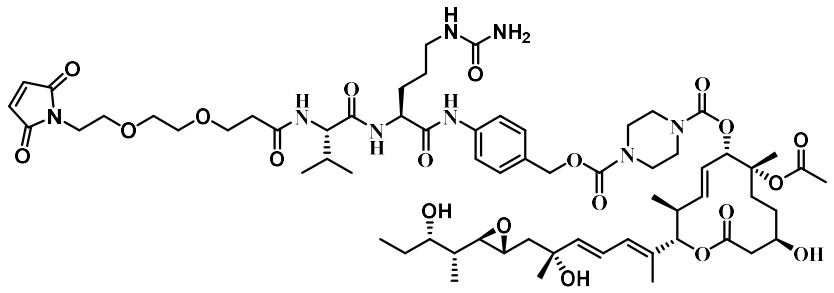


[0999] El procedimiento general 1 (1.3.1) se empleó para la preparación de ADL1–

D5 usando D5. La cromatografía flash proporcionó (14 mg, 51.6% de rendimiento). LCMS (ESI, m/z), 1276.43 $[M+H]^+$

[1000] 1H RMN (400 MHz, METANOL–*d*4) δ ppm 0.86 – 1.00 (m, 16 H) 1.23 – 1.40 (m, 7 H) 1.42 – 1.69 (m, 16 H) 1.73 – 1.80 (m, 4 H) 1.84 – 1.96 (m, 4H) 1.98 – 2.10 (m, 4 H) 2.27 (t, J=7.40 Hz, 2 H) 2.31 – 2.41 (m, 1 H) 2.50 (br d, J=3.39 Hz, 2 H) 2.56 – 2.64 (m, 1 H) 2.64 – 2.72 (m, 1 H) 2.80 – 2.93 (m, 1 H) 3.12 (br d, J=6.90 Hz, 1 H) 3.16 – 3.26 (m, 1 H) 3.35 – 3.56 (m, 7 H) 3.76 – 3.86 (m, 1 H) 4.16 (d, J=7.40 Hz, 1 H) 4.48 – 4.58 (m, 3H) 4.93 – 5.16 (m, 4 H) 5.65 (br d, J=9.91 Hz, 1 H) 5.70 – 5.82 (m, 1 H) 5.88 (d, J=15.18 Hz, 1 H) 6.14 (br d, J=11.04 Hz, 1 H) 6.50 – 6.58 (m, 1 H), 6.79 (s, 2 H) 7.26 – 7.36 (m, 2 H) 7.56 – 7.63 (m, 2 H)

1.3.3 Síntesis de ADL22–D4



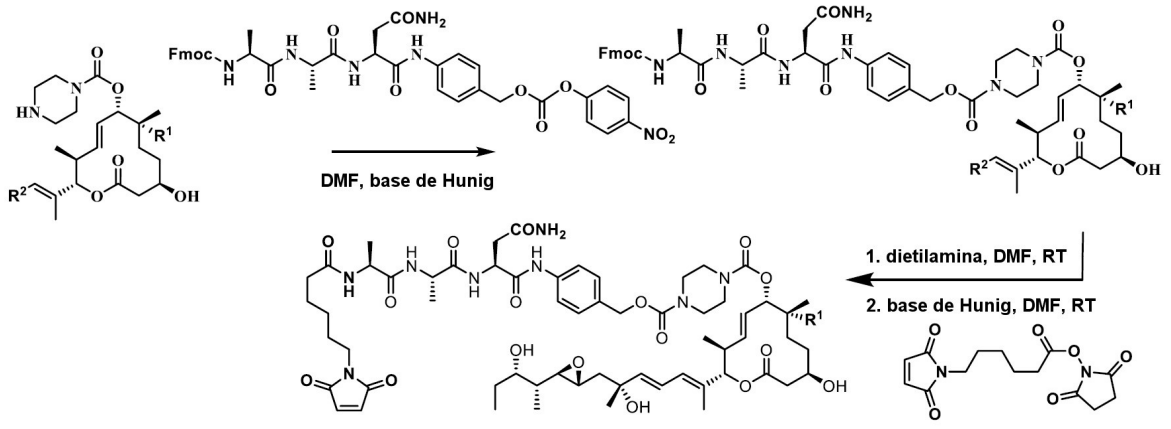
[1001] A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (12 mg, 0.018 mmol) en DMF (2 ml) se agregó 4–((2S,5S)–15–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)–5–isopropil–4,7–dioxo–2–(3–ureidopropil)–10,13–dioxa–3,6–diazapentadecanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (16.98 mg, .022 mmol) y base de Hunig (7.00 mg, .054 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h a 20 ˚C. La mezcla se concentró al vacío directamente sobre gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (MeOH/DCM 0–20%) para proporcionar 1–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((2S,5S)–15–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)–5–isopropil–4,7–dioxo–2–(3–ureidopropil)–10,13–dioxa–3,6–diazapentadecanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (12 mg, 9.16 µmol, 50.8 % de rendimiento) en forma de sólido blanco. LCMS (ESI, m/z), 1310.2 $[M+H]^+$

[1002] Fórmula química: C65H96N8O20 Peso molecular: 1309.52

[1003] 1H RMN (400 MHz, DMSO–*d*6) δ ppm 0.73 – 0.89 (m, 17 H) 1.03 – 1.13 (m, 1 H) 1.21 – 1.25 (m, 4 H) 1.25 – 1.40 (m, 5 H) 1.42 – 1.47 (m, 4 H) 1.48, (br s, 3 H) 1.69 (s, 4 H) 1.73 – 1.83 (m, 1 H) 1.99 (s, 2 H) 2.10 – 2.25 (m, 1 H) 2.36 (br s, 3 H) 2.40 – 2.48 (m, 2 H) 2.54 – 2.66 (m, 2 H) 2.72 – 2.80, (m, 1 H) 2.88 – 3.08 (m, 2 H) 3.34 – 3.44 (m, 9 H) 3.44 –

3.48 (m, 3 H) 3.48 – 3.52 (m, 2 H) 3.52 – 3.59 (m, 3 H) 3.64 – 3.75 (m, 1 H) 4.24 (s, 1 H), 4.40 (br d, J=5.65 Hz, 2 H) 4.62 (d, J=5.02 Hz, 1 H) 4.80 – 4.85 (m, 1 H) 4.90 (br d, J=9.03 Hz, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.40 (s, 2 H) 5.48 – 5.57 (m, 1 H), 5.66 – 5.76 (m, 1 H) 5.81 – 5.91 (m, 1 H) 5.94 – 6.01 (m, 1 H) 6.02 – 6.11 (m, 1 H) 6.36 – 6.45 (m, 1 H) 7.02 (s, 2 H) 7.27 – 7.33 (m, 2 H) 7.58 (s, 2H) 7.81 – 7.89 (m, 1 H) 8.11 (br d, J=7.40 Hz, 1 H) 9.96 – 10.02 (m, 1 H)

1.3.4 Procedimiento general para la síntesis de ADL21–D12, ADL21–D1, ADL21–D4:



Paso 1

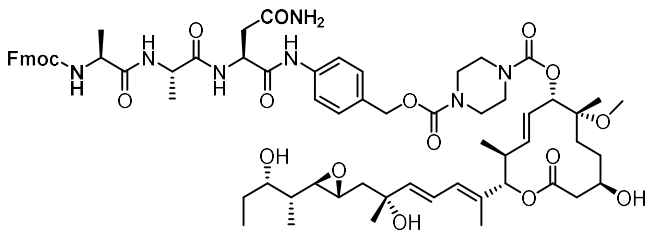
[1004] La carga útil (1.0 equiv) y (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–1–(((S)–1–(((S)–4–amino–1–((4–((((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)–1,4–dioxobutan–2–il)amino)–1–oxopropan–2–il)amino)–1–oxopropan–2–il)carbamato (1.0 equiv.) se disolvieron en DMF (0.1M) y se agregó base de Hunig (3.0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a rt durante 30 minutos, tras lo cual la reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se cromatografió (MeOH / DCM) para proporcionar el producto deseado.

Pasos 2 y 3

[1005] La carga útil fmoc–Ala–Ala–aspargina PABC (1.0 equiv.) se disolvió en N,N–dimetilformamida (0.05 M), y luego se agregó dietilamina (6.0 equiv.). La reacción se agitó a rt durante 1 hora, y la mezcla se evaporó hasta la sequedad. El producto en bruto se diluyó con N,N–dimetilformamida (0.05 M). Se agregó 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (1.2 equiv.) y base de Hunig (2.5 equiv.) a la mezcla y se agitó a rt durante 1 hora. La mezcla luego se concentró al vacío, y el residuo resultante se purificó por HPLC en fase inversa para proporcionar la maleimidocaprolil Ala–Ala–aspargina PABC enlazador carga útil deseada.

1.3.4.1 ADL21–D1

Paso 1:

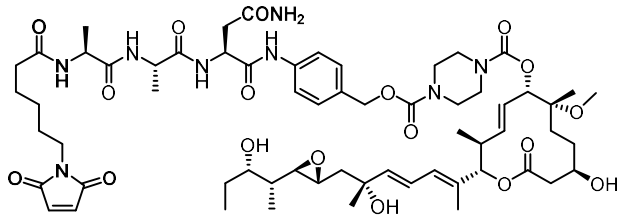


[1006] 1–(4–((5S,8S,11S)–11–(2–amino–2–oxoetil)–1–(9H–fluoren–9–il)–5,8–dimetil–3,6,9–trioxo–2–oxa–4,7,10–triazadodecan–12–amido)bencil) 4–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (140.2 mg, 71.9%) LCMS (ESI, m/z) 1265.6 $[M+H]^+$

Fórmula química: $C_{67}H_{89}N_7O_{17}$

Peso molecular: 1264.48

Pasos 2 y 3:

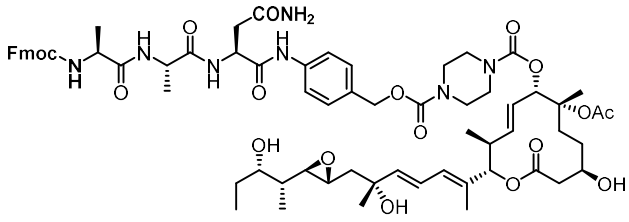


[1007] 1–(4–((S)–4–amino–2–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)propanamido)propanamido)–4–oxobutanamido)bencil) 4–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (49.1 mg, 35.8%) LCMS (ESI, m/z) 1258.19 $[M+Na]^+$

[1008] ^{1}H RMN (400 MHz, METANOL–*d*4) δ ppm 0.85 – 0.98 (m, 10 H) 1.22 (s, 4 H) 1.26 – 1.45 (m, 14 H) 1.45 – 1.69 (m, 12 H) 1.79 (s, 3 H) 1.90 (s, 2H) 2.20 – 2.27 (m, 2 H) 2.52 (br dd, *J*=10.10, 3.70 Hz, 3 H) 2.67 (br d, *J*=2.13 Hz, 1 H) 2.85 (t, *J*=6.15 Hz, 3 H) 3.14 (t, *J*=1.57 Hz, 1 H) 3.41 – 3.57, (m, 14 H) 3.78 – 3.88 (m, 1 H) 4.27 (dd, *J*=12.36, 7.09 Hz, 2 H) 4.77 (s, 1 H) 4.97 – 5.13 (m, 6 H) 5.51 – 5.64 (m, 1 H) 5.72 (br d, *J*=9.66 Hz, 1 H), 5.88 (d, *J*=15.43 Hz, 1 H) 6.12 – 6.17 (m, 1 H) 6.47 – 6.61 (m, 1 H) 6.79 (s, 2 H) 7.33 (m, *J*=8.66 Hz, 2 H), 7.68 (m, *J*=8.66 Hz, 2 H)

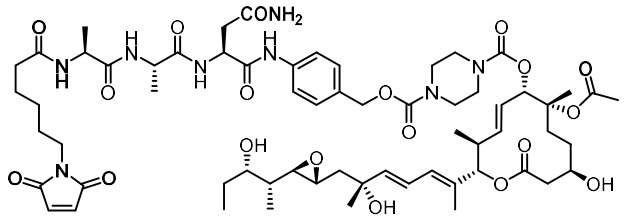
1.3.4.2 ADL21–D4

Paso 1



[1009] 1–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((5S,8S,11S)–11–(2–amino–2–oxoetil)–1–(9H–fluoren–9–il)–5,8–dimetil–3,6,9–trioxo–2–oxa–4,7,10–triazadodecan–12–amido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (125 mg, 85.6%) LCMS (ESI, m/z) 1293.4 $[M+H]^+$

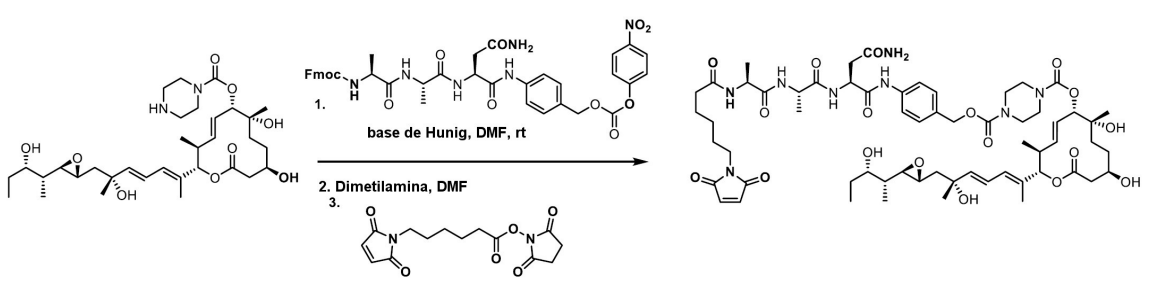
Pasos 2 y 3



[1010] 1–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–4–amino–2–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)propanamido)propanamido)–4–oxobutanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (35 mg, 80%) LCMS (ESI, m/z) 1285.0 $[M+Na]^+$

[1011] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d6) δ ppm 0.71 – 0.87 (m, 9 H) 1.04 – 1.12 (m, 1 H) 1.14 – 1.26 (m, 13 H) 1.27 – 1.40 (m, 3 H) 1.40 – 1.52 (m, 9 H) 1.52 – 1.62 (m, 1 H) 1.69 (s, 3 H) 1.74 – 1.83 (m, 1 H) 1.99 (d, J=4.27 Hz, 4 H) 2.03 – 2.14 (m, 2 H) 2.15 – 2.26 (m, 1 H) 2.31 – 2.41 (m, 2 H) 2.54 – 2.65 (m, 4 H) 2.72 – 2.80 (m, 1 H) 3.17 (d, J=5.27 Hz, 3 H) 3.36 (br s, 9 H) 3.63 – 3.74 (m, 1 H) 3.99 – 4.12 (m, 2 H) 4.14 – 4.22 (m, 1 H) 4.23 – 4.30 (m, 1 H) 4.40 (d, J=5.65 Hz, 1 H) 4.55 – 4.65 (m, 2 H) 4.82 (s, 1 H) 4.87 – 4.93 (m, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.47 – 5.57 (m, 1 H) 5.66 – 5.77 (m, 1 H) 6.01 – 6.09 (m, 1 H) 6.35 – 6.45 (m, 1 H) 6.89 – 6.96 (m, 1 H) 6.99 (s, 2 H) 7.30 (d, J=8.66 Hz, 2 H) 7.36 – 7.42 (m, 1 H) 7.62 (s, 2 H) 7.97 – 8.21 (m, 3 H), 9.62 – 9.72 (m, 1 H).

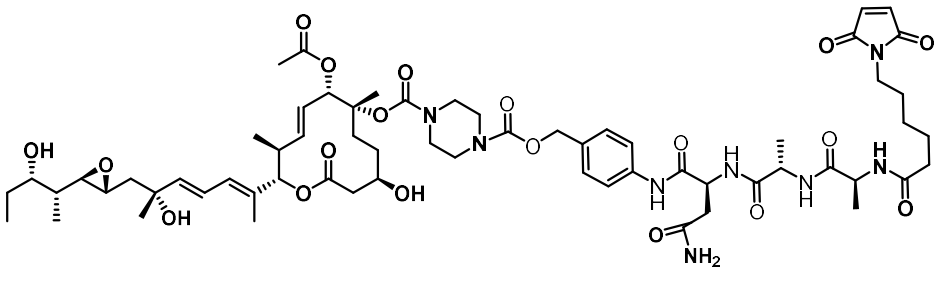
1.3.5 ADL21–D12



[1012] A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7,10–dihidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (50 mg,

0.08 mmol) en DMF (1 ml) se agregó (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–1–(((S)–1–(((S)–4–amino–1–((4–((((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)–1,4–dioxobutan–2–il)amino)–1–oxopropan–2–il)amino)–1–oxopropan–2–il)carbamato (73.9 mg, 0.096 mmol) seguido por N–etil–N–isopropilpropan–2–amina (104 mg, 0.803 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se concentraron para proporcionar un aceite transparente, que se llevó directamente al siguiente paso suponiendo un 100% de rendimiento. El aceite obtenido luego se disolvió en DMF (2 ml) y se cargó con dietilamina (58.7 mg, 0.803 mmol). La mezcla resultante se agitó 1 h a 20 ˚C y se concentró al vacío. El residuo se redisolvió en DMF (1 ml) y luego se agregó 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (32.2 mg, 0.104 mmol) y N–etil–N–isopropilpropan–2–amina (104 mg, 0.803 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y se purificó por HPLC en fase inversa para proporcionar 1–(4–((S)–4–amino–2–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)propanamido)propanamido)–4–oxobutanamido)bencil) 4–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7,10–dihidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (7.5 mg, 6.14 µmol, 7.65 % de rendimiento) en forma de sólido blanco. LCMS (ESI, m/z) 1222.28 $[M+H]^+$

1.3.6 ADL21–D8

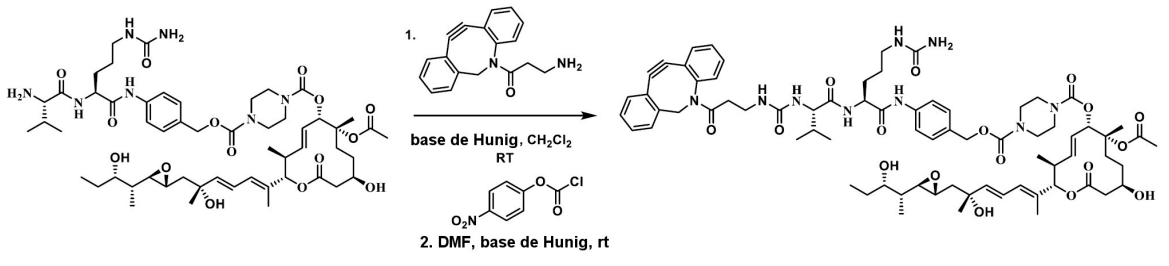


[1013] A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–7–il piperazin–1–carboxilato (27.0 mg, .041 mmol) en DMF se agregó (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–1–(((S)–1–(((S)–4–amino–1–((4((((4nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)–1,4–dioxobutan–2–il)amino)–1–oxopropan–2–il)amino)–1–oxopropan–2–il)carbamato (40.5 mg, .053 mmol) seguido de base de Hunig (36.2 µl, 0.203 mmol). Luego de agitar durante 20 minutos a rt, la mezcla se concentró al vacío y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (0–20% MeOH/DCM) para proporcionar el intermediario deseado. El residuo luego se combinó con DMF (2 ml) y dietilamina (29.7 mg, 0.406 mmol) y se agitó durante 20

minutos a rt. Posteriormente, la mezcla se concentró al vacío, y el residuo resultante se redisolvió en DMF (2 ml) y se trató con 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (16.28 mg, .053 mmol) y base de Hunig (36.2 µl, 0.203 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 20 minutos antes de concentrar hasta la sequedad y purificar el residuo resultante por cromatografía en columna con el intermediario eluido en un gradiente 0–20% de MeOH/DCM. El residuo obtenido luego se sometió a purificación por HPLC en fase inversa para proporcionar 1–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–7–il) 4–(4–((S)–4–amino–2–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)propanamido)propanamido)–4–oxobutanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (3.5 mg, 2.77 µmol, 6.82 % de rendimiento) aislado en forma de sólido blanco. 1–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–6–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–7–il) 4–(4–((S)–4–amino–2–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)propanamido)propanamido)–4–oxobutanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (3.5 mg, 6.8%) LCMS (ESI, m/z) 1285.60 $[M+Na]^+$

[1014] ^{1}H RMN: 0.68 – 0.90 (m, 11 H) 1.03 – 1.13 (m, 2 H) 1.15 – 1.26 (m, 14 H) 1.24 – 1.38 (m, 4 H) 1.40 – 1.63 (m, 12 H), 1.69 (s, 3 H) 1.74 – 1.83 (m, 1 H) 2.03 (s, 3 H) 2.06 – 2.12 (m, 2 H) 2.24 – 2.41 (m, 3 H) 2.53 – 2.63 (m, 4 H), 3.79 – 3.80 (m, 1H) 4.13 – 4.30 (m, 2 H) 4.32 – 4.33 (m, 1 H) 4.33 – 4.47 (m, 1 H) 4.44 – 4.48 (m, 1 H) 4.52 – 4.73 (m, 2 H) 4.74 – 4.97 (m, 2 H) 5.03 (s, 3 H) 5.47 – 5.61 (m, 1 H) 5.65 – 5.77 (m, 1 H) 5.79 – 5.92 (m, 1 H) 5.98 – 6.12 (m, 1 H) 6.30 – 6.46 (m, 1 H) 6.75 – 6.85 (m, 1 H) 6.90 – 6.95 (m, 1 H) 6.99 (s, 1H) 7.26 – 7.36 (m, 2 H) 7.37 – 7.46 (m, 1 H) 7.56 – 7.73 (m, 2 H) 7.90 – 8.09 (m, 1 H) 8.07 – 8.22 (m, 2 H) 8.46 (s, 1 H) 9.59 – 9.78 (m, 1 H)

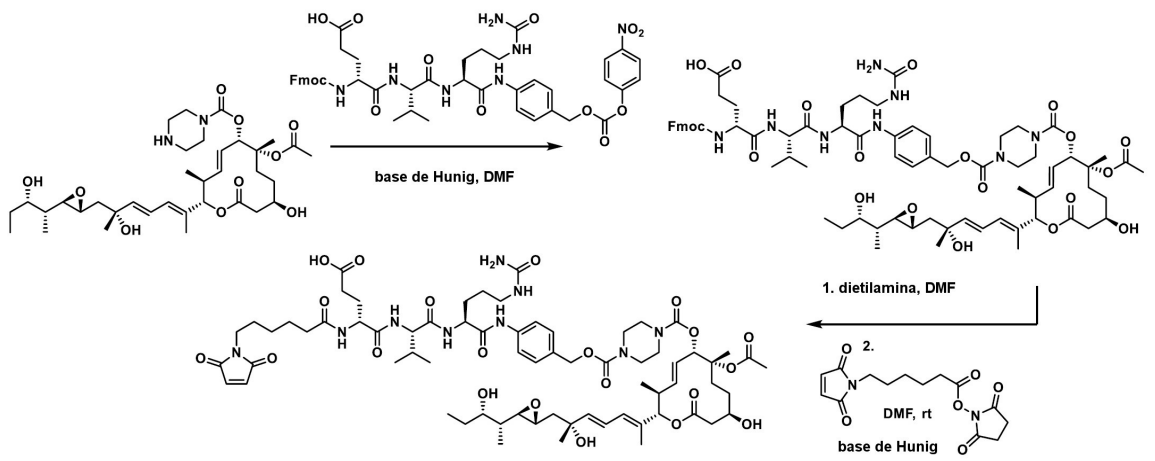
1.3.7 Preparación de DBCO–Val–Cit–pABC enlazador–carga útil, ADL25–D4



[1015] A una solución de 3–amino–1–(11,12–dihidrodibenzo[b,f]azocin–5(6H)–il)propan–1–ona (19.36 mg, 0.07 mmol) en DCM (5 ml) a 0 ˚C se agregó base de Hunig (10.26 mg, 0.079 mmol) seguida de carbonocloridato de 4–nitrofenilo (14.12 mg, 0.07

mmol). La reacción se calentó hasta 20 ˚C y se agitó durante 2 h. La mezcla luego se concentró hasta la sequedad y se diluyó con DMF. La mezcla resultante se cargó con base de Hunig (10.26 mg, .079 mmol) y 1–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–2–((S)–2–amino–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (50 mg, .047 mmol) y se agitó durante 1 h. La mezcla luego se concentró hasta la sequedad y se purificó por cromatografía en columna seguida por purificación en fase inversa para proporcionar 1–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((9S,12S)–9–isopropil–3,7,10–trioxo–12–(3–ureidopropil)–2,6,8,11–tetraazatridecan–13–dibenzenecicloctyneamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (5.3 mg, 8.27%) LCMS (ESI, m/z) 1372.7 $[M]^+$

1.3.8. Preparación de maleimido–Glu–Val–Cit–pABC enlazador–carga útil



[1016] A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (20 mg, 0.03 mmol) en DMF (1 ml) se agregó ácido (S)–4–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–5–(((S)–3–metil–1–(((S)–1–((4–((((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–il)amino)–1–oxobutan–2–il)amino)–5–oxopentanoico (32.3 mg, 0.036 mmol) y base de Hunig (11.66 mg, 0.09 mmol) y se agitó 1 h a 20 ˚C. Luego se agregó dietilamina (110 mg, 1.504 mmol), y la mezcla se agitó durante 30 minutos más a 20 ˚C. La mezcla luego se diluyó con acetato de etilo y se concentró al vacío. El residuo resultante se diluyó con DMF (1 ml), 2,5–dioxopirrolidin–1–il–6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (13.91 mg, 0.045 mmol) y base de Hunig (11.66 mg, 0.09 mmol) y la reacción se agitó durante 50

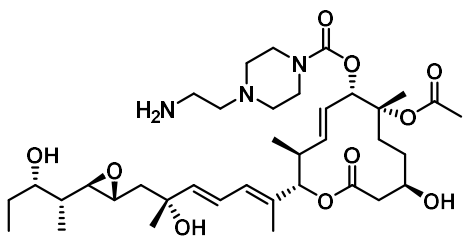
minutos. La mezcla de reacción luego se diluyó con acetato de etilo, se concentró hasta la sequedad y se purificó usando HPLC en fase inversa para proporcionar ácido (S)–5–(((S)–1–(((S)–1–((4–(((4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–1–carbonil)oxi)metil)fenil)amino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–il)amino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)amino)–4–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–5–oxopentanoico (9.3 mg, 6.68 µmol, 22.20 % de rendimiento) en forma de sólido blanco; LCMS (ESI, m/z) 1393.4 $[M+H]^+$

[1017] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–*d*6) δ ppm 0.74 – 0.89 (m, 16 H) 1.03 – 1.66 (m, 25 H) 1.69 (s, 4 H) 1.74 – 1.94 (m, 2 H) 2.00 (s, 4 H) 2.09 (br d, J=4.39 Hz, 2 H) 2.21 (br d, J=7.53 Hz, 3 H) 2.31 – 2.42 (m, 2 H) 2.53 – 2.84 (m, 3 H) 2.89 – 3.09 (m, 2 H) 3.34 – 3.48 (m, 10 H) 3.65 – 3.74 (m, 1 H) 4.19, (dd, J=8.47, 6.59 Hz, 1 H) 4.26 – 4.45 (m, 3 H) 4.57 – 4.64 (m, 1 H) 4.79 – 4.85 (m, 1 H) 4.90 (br d, J=9.03 Hz, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.43 (br s, 2 H), 5.47 – 5.59 (m, 1 H) 5.67 – 5.80 (m, 1 H) 5.81 – 5.93 (m, 1 H) 5.94 – 6.14 (m, 2 H) 6.35 – 6.47 (m, 1 H) 6.99 (s, 2 H) 7.30 (d, J=8.66 Hz, 2 H) 7.58, (d, J=8.53 Hz, 2 H) 7.63 – 7.71 (m, 1 H) 7.98 – 8.06 (m, 1 H) 8.15 – 8.27 (m, 1 H) 9.99 – 10.09 (m, 1 H)

1.3.10. ADL1–D3, ADL10–D3

[1018] La carga útil D3 se preparó a través del procedimiento proporcionado a continuación.

D3



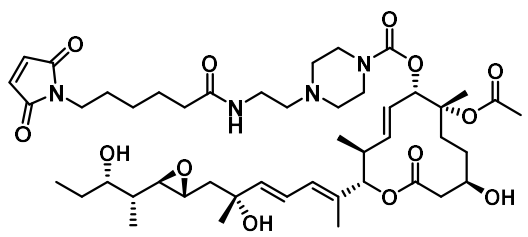
[1019] A una mezcla de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (55 mg, 0.083 mmol) en DCM (3 ml) se le agregó (9H–fluoren–9–il)metil (2–oxoetil)carbamato (46.5 mg, 0.165 mmol) y triacetoxi borohidruro de sodio (52.6 mg, 0.248 mmol). La reacción se agitó durante 20 minutos a rt. La mezcla de reacción luego se concentró hasta la sequedad y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0–10% MeOH/DCM). El material purificado se disolvió en DMF (3 ml). La mezcla luego se cargó con dietilamina (121 mg, 1.655 mmol) y se agitó a rt. La mezcla luego se concentró al vacío y se purificó por HPLC en fase inversa para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–

2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–aminoetil)piperazin–1–carboxilato (6 mg, 8.48 µmol, 10.25% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

[1020] LCMS (ESI, m/z), 708.2 $[M+H]^+$

[1021] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–*d*6) δ ppm 0.74 – 0.86 (m, 9 H) 1.04 – 1.15 (m, 1 H) 1.23 (s, 3 H) 1.26 – 1.40 (m, 3 H) 1.45 (s, 4 H) 1.47 – 1.51 (m, 1 H), 1.52 – 1.63 (m, 1 H) 1.69 (s, 3 H) 1.73 – 1.82 (m, 1 H) 1.99 (s, 3 H) 2.13 – 2.42 (m, 9 H) 2.53 – 2.65 (m, 4 H) 2.72 – 2.80 (m, 1 H), 3.35 – 3.41 (m, 3 H) 3.65 – 3.76 (m, 1 H) 4.36 – 4.46 (m, 1 H) 4.57 – 4.66 (m, 1 H) 4.79 – 4.85 (m, 1 H) 4.87 – 4.95 (m, 2 H) 5.43 – 5.56 (m, 1 H) 5.64 – 5.77 (m, 1 H) 5.80 – 5.91 (m, 1 H) 6.01 – 6.12 (m, 1 H) 6.33 – 6.49 (m, 1 H).

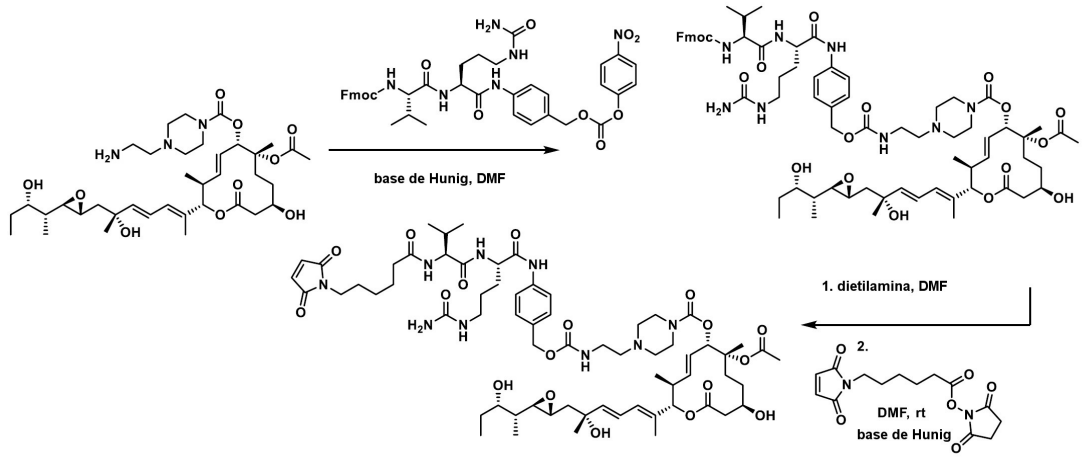
1.3.10.1 ADL10–D3



[1022] A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–aminoetil)piperazin–1–carboxilato (40 mg, .057 mmol) en DMF (2 ml) se le agregó 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (27.9 mg, 0.09 mmol) seguido de base de Hunig (36.5 mg, 0.283 mmol) y se agitó durante 20 minutos. La mezcla resultante luego se concentró sobre gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (0–20% MeOH/DCM) para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)etil)piperazin–1–carboxilato (22 mg, 43.2 % de rendimiento) en forma de sólido amarillento. LCMS (ESI, m/z) 902.1 $[M+H]^+$

[1023] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d6) δ ppm 0.73 – 0.89 (m, 10 H) 0.99 – 1.29 (m, 10 H) 1.30 – 1.38 (m, 2 H) 1.40 – 1.49 (m, 9 H) 1.52 – 1.64 (m, 1 H), 1.69 (s, 3 H) 1.74 – 1.83 (m, 1 H) 1.93 – 2.07 (m, 5 H) 2.34 (br d, J=16.94 Hz, 9 H) 2.59 (s, 3 H) 3.07 – 3.21 (m, 2 H) 3.36 (br d, J=14.05 Hz, 3 H) 3.66 – 3.78 (m, 1 H) 4.37 – 4.45 (m, 1 H) 4.57 – 4.66 (m, 1 H) 4.79 – 4.86 (m, 1 H) 4.87 – 4.97 (m, 2 H) 5.46 – 5.57 (m, 1 H) 5.66 – 5.75 (m, 1 H) 5.81 – 5.91 (m, 1 H) 5.99 – 6.13 (m, 1 H) 6.31 – 6.47 (m, 1 H) 7.00 (s, 2 H) 7.62 – 7.71 (m, 1 H)

1.3.10.2 ADL1–D3

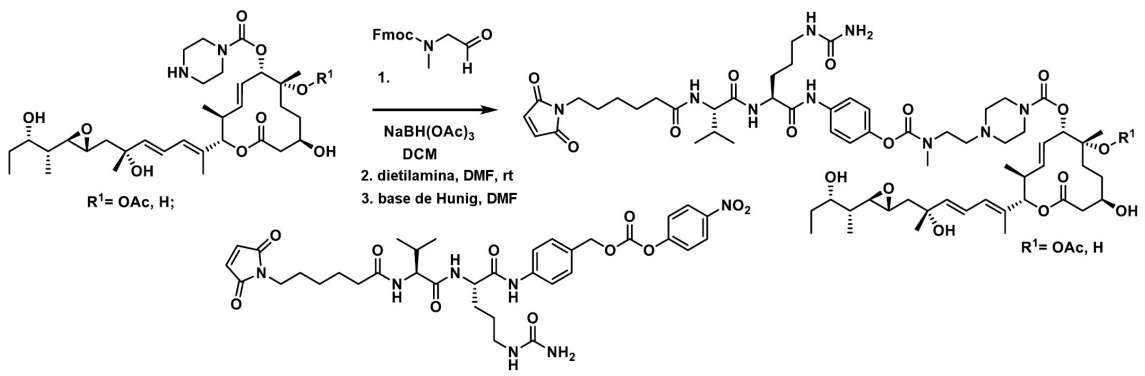


[1024] A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–aminoetil)piperazin–1–carboxilato (30 mg, 0.042 mmol) en DMF (2 ml) se le agregó (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–3–metil–1–(((S)–1–((4–((((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–il)amino)–1–oxobutan–2–il)carbamato (35.7 mg, 0.047 mmol) seguido por base de Hunig (16.43 mg, 0.127 mmol) y la mezcla se dejó en agitación durante 1 h. La mezcla resultante se concentró directamente sobre gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–((((4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)etil)piperazin–1–carboxilato, el cual se llevó directamente al siguiente paso. A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–((((4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)etil)piperazin–1–carboxilato (30 mg, 0.022 mmol) en DMF (2 ml) se le agregó dietilamina (82 mg, 1.123 mmol) y la mezcla se dejó en agitación durante 1 h a 20 °C. La mezcla resultante se diluyó con acetato de etilo y se concentró al vacío. El residuo resultante luego se redisolvió en DMF y se cargó con 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (8.31 mg, 0.027 mmol) y base de Hunig (8.71 mg, .067 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a 20 ˚C. La solución luego se concentró sobre gel de sílice y se purificó por cromatografía en columna (0–20% MeOH/DCM) para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–

6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–((((4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)etil)piperazin–1–carboxilato (25 mg, 0.019 mmol, 85 % de rendimiento) en forma de sólido blanco; LC/MS (ESI, m/z), 1306.2 $[M]^+$.

[1025] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–d_6) δ ppm 0.75 – 0.89 (m, 18 H) 1.05 – 1.12 (m, 1 H) 1.15 – 1.20 (m, 1 H) 1.21 – 1.26 (m, 4 H) 1.26 – 1.39 (m, 5 H) 1.40 – 1.40 (m,1 H) 1.42 – 1.47 (m, 5 H) 1.57 (br s, 3 H) 1.69 (s, 4 H) 1.73 – 1.81 (m, 1 H) 1.92 – 1.98 (m, 1 H) 1.99 (d, *J*=4.39 Hz, 4 H) 2.14 – 2.26 (m, 1 H) 2.29 – 2.42 (m, 4H) 2.42 – 2.47 (m, 1 H) 2.53 – 2.64 (m, 2 H) 2.73 – 2.78 (m, 1 H) 2.88 – 3.08 (m, 2 H) 3.35 – 3.60 (m, 19 H) 3.65 – 3.75 (m, 1 H) 4.22 (dd, *J*=8.47, 6.71 Hz, 1H) 4.32 – 4.45 (m, 2 H) 4.60 – 4.65 (m, 1 H) 4.79 – 4.85 (m, 1 H) 4.90 (br d, *J*=9.03 Hz, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.40 (s, 2 H) 5.47 – 5.58 (m, 1 H) 5.66 – 5.77 (m, 1H) 5.87 (s, 1 H) 5.97 (s, 1 H) 6.03 – 6.13 (m, 1 H) 6.35 – 6.45 (m, 1 H) 7.02 (s, 2 H) 7.30 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H) 7.59 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H) 7.81 – 7.88 (m, 1 H), 8.09 – 8.15 (m, 1 H) 9.90 – 10.09 (m, 1 H)

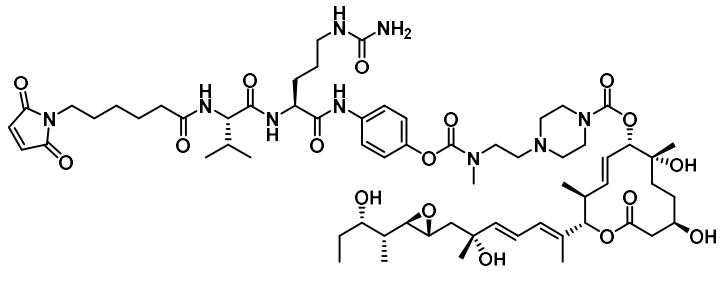
1.3.11 ADL1–D6 y ADL1–D7 se prepararon a través del procedimiento general a continuación.



[1026] A una solución de (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–acetoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (30 mg, 0.045 mmol) en DCM (0.1 M) se le agregó (9H–fluoren–9–il)metil metil(2–oxoetil)carbamato (5 equiv.) y triacetoxi borohidruro de sodio (10 equiv.) y se agitó durante 30 minutos. La mezcla luego se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se concentró y se purificó por cromatografía en columna (gradiente de 0–10% MeOH/DCM) para aislar el producto deseado. El material resultante luego se diluyó con DMF (0.1M), se cargó con dietilamina (20 equiv.) y se agitó durante 20 minutos. La mezcla luego se concentró hasta la sequedad y se diluyó nuevamente en DMF y se cargó con 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–

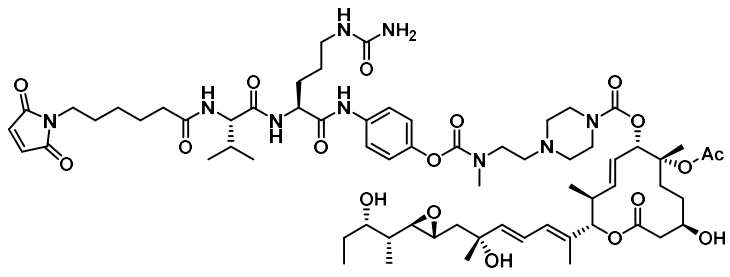
dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (1.2 equiv.), luego base de Hunig (3.0 equiv.). La mezcla se agitó durante 30 minutos, se concentró al vacío, y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el producto deseado.

1.3.11.2 ADL1–D7



[1027] El procedimiento general 1 (1.3.11) proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7,10–dihidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–(((4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)fenoxi)carbonil)(metil)amino)etil)piperazin–1–carboxilato (3.1 mg, 5.03 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1278.4 $[M+H]^+$.

1.3.11.2 ADL1–D6

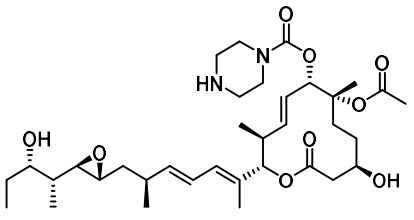


[1028] El procedimiento general 1 (1.3.11) proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7-acetoxi-10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–(((4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)fenoxi)carbonil)(metil)amino)etil)piperazin–1–carboxilato (2 mg, 3.36 % de rendimiento LC/MS (ESI, m/z), 1321.37 $[M+H]^+$.

1.3.1.5 ADL1–D9, ADL6–D9, & ADL1–D13

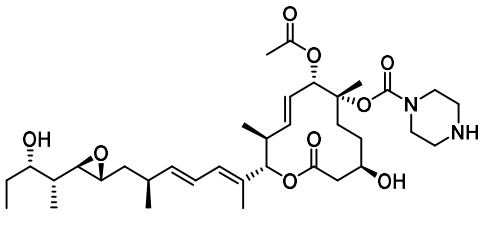
D9 y D13

[1029] D9 y D13 se sintetizaron como una mezcla 3:1 de isómeros empleando los procedimientos descritos en la síntesis de D4 (Esquema 4) utilizando tri–TES Pladienolida B.



[1030] Carga útil (D9): LC/MS (ESI, m/z), 649.7 $[M+H]^+$.

[1031] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.87 – 1.01 (m, 10 H) 1.08 (d, J=6.78 Hz, 3 H) 1.27 – 1.63 (m, 12 H) 1.66 – 1.74 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.97 – 2.10 (m, 3 H) 2.35 – 2.57 (m, 5 H) 2.58 – 2.65 (m, 1 H) 2.65 – 2.71 (m, 1 H) 2.77 (td, J=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 2.89 – 3.05 (m, 4 H) 3.07 – 3.34 (m, 8 H) 3.50 – 3.68 (m, 5 H) 3.72 – 3.88 (m, 1 H) 4.88 – 5.09 (m, 1 H) 5.18 (d, J=10.67 Hz, 1 H) 5.50 – 5.84 (m, 3 H) 6.01 – 6.13 (m, 1 H) 6.19 – 6.36 (m, 1 H).

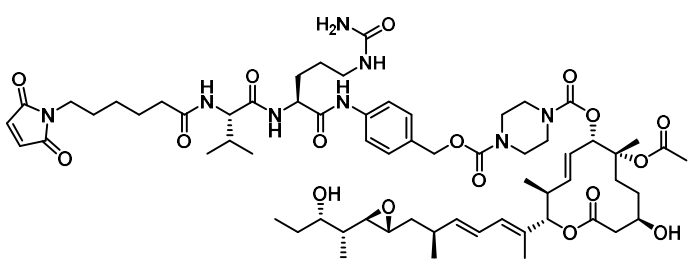


[1032] Carga útil (D13): LC/MS (ESI, m/z), 649.6 $[M+H]^+$.

[1033] ^{1}H RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*) δ ppm 0.84 – 1.01 (m, 11 H) 1.08 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.29 – 1.64 (m, 10 H) 1.63 – 1.73 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.94 – 2.12 (m, 4 H) 2.37 – 2.58 (m, 4 H) 2.59 – 2.65 (m, 1 H) 2.68 (dd, *J*=7.40, 2.26 Hz, 1 H) 2.77 (td, *J*=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 3.01 – 3.30 (m, 4 H) 3.49 (s, 1 H) 3.54 – 3.67 (m, 2 H) 3.69 – 3.92 (m, 5 H) 4.13 – 4.78 (m, 11 H) 5.13 – 5.24 (m, 2 H) 5.48 – 5.61 (m, 1 H) 5.62 – 5.74 (m, 2 H) 6.04 – 6.13 (m, 1 H) 6.18 – 6.32 (m, 1 H).

ADL1–D9

[1034] El procedimiento general 1 (descrito en la sección 1.3.1) se empleó para sintetizar ADL1–D9.



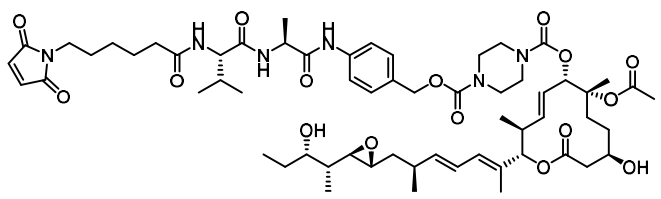
[1035] Enlazador–carga útil (ADL1–D9): (30.5 mg, 0.024 mmol, 77 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$.

[1036] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.87 – 0.93 (m, 7 H) 0.93 – 1.01 (m, 8 H) 1.19 – 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H) 1.58 – 1.70 (m, 6 H) 1.70 – 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 – 1.95 (m, 2 H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 – 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 – 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 – 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.03 – 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 – 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10

Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 – 5.69 (m, 1 H) 5.72 – 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 – 6.22 (m, 1 H) 6.44 – 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H).

ADL6–D9

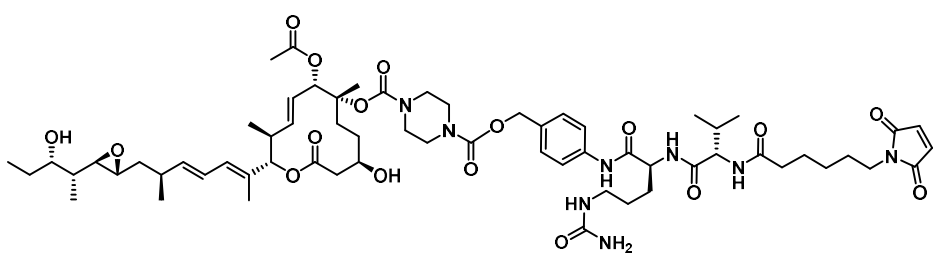
[1037] El procedimiento general 1 (descrito en la sección 1.3.1) se empleó para sintetizar ADL6–D9.



[1038] Enlazador–carga útil (ADL6–D9): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato diluido (16.5 mg, 0.025 mmol) en DMF (784 µL) se agregó base de Hunig (13.27 µL, 0.076 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, y se agregó D9. La mezcla de reacción se agitó a rt hasta que la LC/MS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró al vacío. La cromatografía flash del residuo en gel de sílice con DCM/MeOH proporcionó el compuesto del título (16.7 mg, 57% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1184.6 $[M+Na]^+$.

[1039] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.80 – 1.02 (m, 16 H) 1.05 – 1.12 (m, 4 H) 1.13 – 1.34 (m, 5 H) 1.38 – 1.51 (m, 7 H) 1.53 – 1.68 (m, 11 H) 1.71 – 1.80 (m, 4 H) 1.97 – 2.16 (m, 4 H) 2.24 – 2.32 (m, 2 H) 2.32 – 2.42 (m, 1 H) 2.43 – 2.55 (m, 3 H) 2.56 – 2.69 (m, 3 H) 2.73 (br d, *J*=2.13 Hz, 1 H) 3.07 – 3.18 (m, 1 H) 3.42 – 3.61 (m, 17 H) 3.75 – 3.91 (m, 1 H) 4.11 – 4.24 (m, 1 H) 4.43 (s, 2 H) 5.59 – 5.88 (m, 4 H) 6.06 – 6.17 (m, 1 H) 6.29 – 6.39 (m, 1 H) 7.24 – 7.39 (m, 2 H) 7.52 – 7.64 (m, 2 H).

ADL1–D13

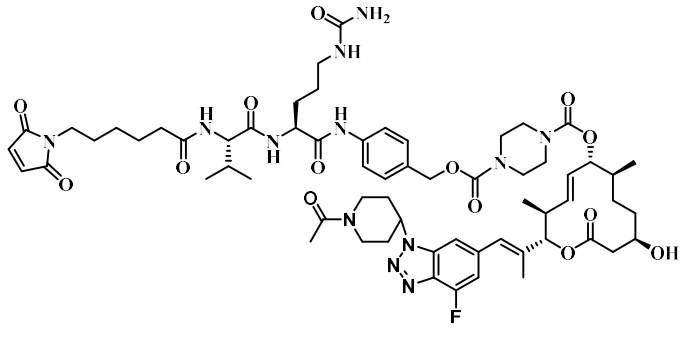


[1040] Enlazador–carga útil (AD1–D13): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (4.2 mg, 5.693 µmol) en DMF (176 µL, 2.277 mmol) se agregó base de Hunig (2.98 µL, 0.017 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, y se agregó D13 (4.06 mg, 6.262 µmol). La mezcla de reacción se agitó a rt hasta que la LC/MS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró al vacío. La cromatografía flash del residuo en gel de sílice con DCM/MeOH proporcionó el compuesto

del título (4.8 mg, 68% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1248.0 $[M+H]^+$.

[1041] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.58 – 0.98 (m, 10 H) 0.99 – 1.06 (m, 2 H) 1.11 – 1.31 (m, 6 H) 1.57 – 1.75 (m, 3 H) 2.11 – 2.26 (m, 1 H) 2.30 – 2.73 (m, 2 H) 3.28 – 3.80 (m, 7 H) 4.14 – 4.33 (m, 1 H) 4.44 – 4.55 (m, 1 H) 4.63 – 4.81 (m, 1 H) 4.92 – 5.06 (m, 1 H) 5.09 (s, 1 H) 5.49 – 5.74 (m, 1 H) 5.88 – 6.09 (m, 1 H) 6.14 – 6.36 (m, 1 H) 6.99 – 7.08 (m, 1 H) 7.21 – 7.38 (m, 2 H) 7.53 – 7.67 (m, 1 H) 7.95 (s, 1 H).

1.3.1.6 ADL1–D14

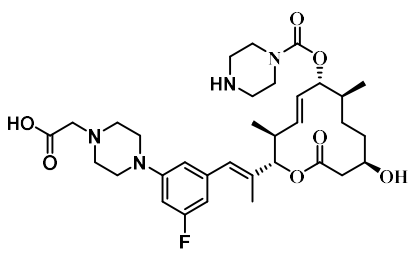


[1042] El procedimiento general 1 (descrito en la sección 1.3.1) se empleó para sintetizar 1–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(1–(1–acetilpiperidin–4–il)–4–fluoro–1H–benzo[d][1,2,3]triazol–6–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (30 mg, 0.024 mmol, 39.2% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1254.5 $[M+H]^+$.

[1043] ^{1}H–RMN (400 MHz, DMSO–d_6): δ ppm 0.75 – 1.00 (m, 12 H), 1.06 – 1.26 (m, 4 H), 1.26 – 1.77 (m, 13 H), 1.75 – 2.02 (m, 7 H), 2.08 (s, 8 H), 2.23 – 2.35 (m, 2 H), 2.54 – 2.70 (m, 2 H), 2.78 – 3.10 (m, 4 H), 3.36 (br s, 13 H), 3.66 – 3.79 (m, 1 H), 3.95 – 4.08 (m, 1 H), 4.11 – 4.25 (m, 1 H), 4.28 – 4.46 (m, 1 H), 4.46 – 4.58 (m, 1 H), 4.58 – 4.66 (m, 1 H), 4.66 – 4.77 (m, 1 H), 5.01 (s, 3 H), 5.14 – 5.27 (m, 1 H), 5.39 (s, 4 H), 5.71 – 5.79 (m, 1 H), 5.87 – 6.00 (m, 1 H), 6.63 – 6.75 (m, 1 H), 6.99 (s, 2 H), 7.13 – 7.24 (m, 1 H), 7.24 – 7.34 (m, 2 H), 7.52 – 7.62 (m, 2 H), 7.65 – 7.74 (m, 1 H), 7.75 – 7.82 (m, 1 H), 7.98 – 8.13 (m, 1 H).

1.3.1.7 ADL1–D33

D33

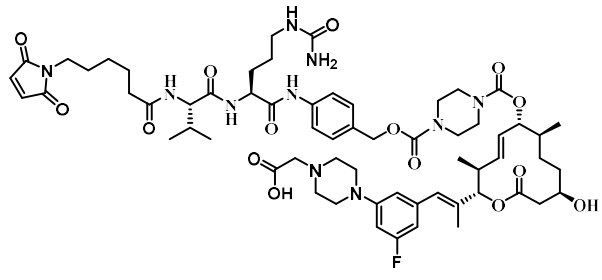


[1044] A una solución agitada de (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–(2–metoxi–2–oxoetil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (27 mg, 0.042 mmol) en THF/H_2O (3

ml/1 ml) a 0 °C se le agregó LiOH, y la mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta 25 °C. (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–(2–metoxi–2–oxoetil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato se sintetizó usando los procedimientos descritos en la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2019/026992 (véase, por ejemplo, los Procedimientos 17 y 19), que se incorpora a la presente por referencia. Al cabo de 6 horas, la mezcla de reacción se neutralizó con tampón de fosfato (NaH_2PO_4, 1.0 M, 3 ml) y las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 2 ml), y las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. La cromatografía en columna en fase inversa proporcionó el compuesto del título (19.4 mg, 0.031 mmol, 73.4 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 631.4 $[M+H]^+$.

[1045] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.85 – 1.16 (m, 2 H) 1.23 – 1.52 (m, 1 H) 1.57 – 1.77 (m, 1 H) 1.87 (s, 1 H) 1.92 – 2.13 (m, 1 H) 2.35 – 2.55 (m, 1 H) 2.50 – 2.74 (m, 1 H) 3.11 (br s, 1 H) 3.36 – 3.54 (m, 2 H) 3.64 (br d, *J*=10.42 Hz, 2 H) 3.77 – 3.90 (m, 1 H) 4.76 (br s, 4 H) 5.07 – 5.19 (m, 1 H) 5.38 – 5.68 (m, 1 H) 6.40 – 6.76 (m, 1 H) 8.02 – 8.66 (m, 1 H).

ADL1–D33

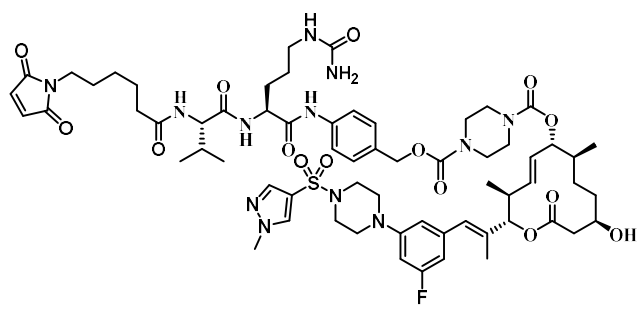


[1046] Enlazador–carga útil (ADL1–D33): A 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (17 mg, .023 mmol) en DMF (714 µL, 9.217 mmol) se le agregó base de Hunig (12.07 µL, 0.069 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y se agregó ácido 2–(4–(3–fluoro–5–((E)–2–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxo–6–((piperazin–1–carbonil)oxi)oxaciclododec–4–en–2–il)prop–1–en–1–il)fenil)piperazin–1–il)acético (16.71 mg, 0.026 mmol). La mezcla de reacción se agitó a rt hasta que la LC/MS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción luego se concentró *al vacío.* La cromatografía flash en gel de sílice y la purificación adicional por HPLC proporcionó el compuesto del título (13.5 mg, 10.98 µmol, 47.7 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1229.5 $[M+H]^+$.

[1047] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d_4): δ ppm 0.92 – 0.99 (m, 10 H) 1.01 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.24 – 1.46 (m, 9 H) 1.52 – 1.70 (m, 10 H) 1.70 – 1.82 (m, 1 H) 1.87 (d, *J*=1.00 Hz, 4

H) 1.89 – 2.00 (m, 2 H) 2.01 – 2.23 (m, 2 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.46 (dd, *J*=14.31, 5.27 Hz, 1 H) 2.57 – 2.71 (m, 2 H) 2.86 (d, *J*=0.63 Hz, 1 H) 3.00 (s, 1 H) 3.06 – 3.27 (m, 4 H) 3.35 (s, 5 H) 3.41 – 3.53 (m, 19 H) 3.66 (s, 2 H) 3.76 – 3.90 (m, 1 H) 4.07 – 4.21 (m, 1 H) 4.39 – 4.69 (m, 37 H) 5.09 (s, 3 H) 5.13 (d, *J*=10.54 Hz, 1 H) 5.52 (dd, *J*=14.56, 9.03 Hz, 2 H) 6.55 (br s, 2 H) 6.69 (d, *J*=1.38 Hz, 2 H) 7.33 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.59 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H) 7.88 – 8.04 (m, 1 H) 8.16 – 8.33 (m, 1 H).

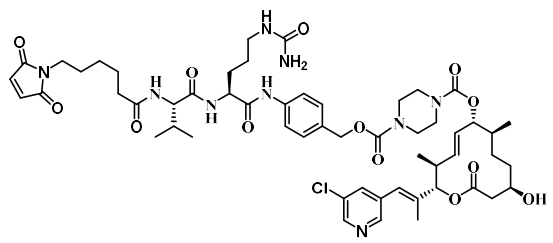
ADL1–D28



[1048] 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (6.17 mg, 8.37 µmol) y (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–((1–metil–1H–imidazol–4–il)sulfonil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (6 mg, 8.37 µmol) se disolvieron en DMF (0.3 ml) y se agregó base de Hunig (4.39 µL, 0.025 mmol). La mezcla de reacción se agitó a rt hasta el día siguiente. El solvente se evaporó y se sometió a purificación por HPLC en fase inversa para proporcionar 1-(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) 4–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–((1–metil–1H–pirazol–4–il)sulfonil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (1.5 mg, 13.6%). LC/MS (ESI, m/z), 1315.66 $[M+H]^+$.

[1049] ^{1}H RMN (400 MHz, METANOL–d4) d ppm 0.85 – 0.93 (m, 12 H) 1.16 – 1.31 (m, 6 H) 1.43 – 1.57 (m, 9 H) 1.62 – 1.70 (m, 1 H) 1.75 (s, 3 H) 1.77 – 1.90 (m, 2 H) 1.96 – 2.03 (m, 1 H) 2.13 – 2.20 (m, 2 H) 2.31 – 2.40 (m, 1 H) 2.46 – 2.55 (m, 2 H) 2.97 – 3.06 (m, 2 H) 3.08 – 3.10 (m, 1 H) 3.15 (br d, J=6.27 Hz, 9 H) 3.33 – 3.43 (m, 10 H) 3.71 (s, 4 H) 4.03 – 4.09 (m, 1 H) 4.37 – 4.44 (m, 1 H) 4.44 – 4.53 (m, 1 H) 4.96 – 5.06 (m, 3 H) 5.33– 5.51 (m, 2 H) 6.36 – 6.44 (m, 2 H) 6.45 – 6.53 (m, 2 H) 6.69 (s, 2 H) 7.19 – 7.25 (m, 2 H) 7.47 – 7.52 (m, 2 H) 7.63 – 7.70 (m, 2 H)

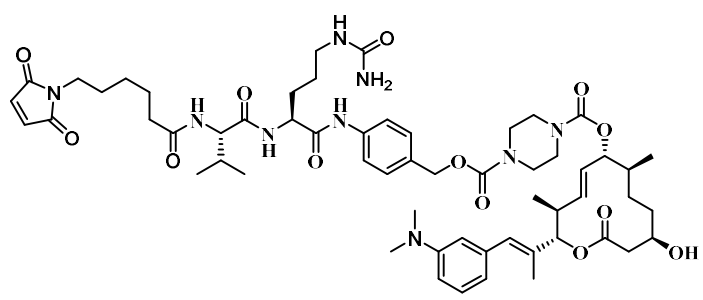
ADL1–D31



[1050] 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (13.12 mg, .018 mmol) y (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(5–cloropiridin–3–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (9 mg, .018 mmol) se disolvieron en DMF (179 µl, 2.312 mmol) y se agregó base de Hunig (9.32 µl, 0.053 mmol). La mezcla de reacción se agitó a rt hasta el día siguiente. El solvente se evaporó y se purificó por HPLC en fase inversa para proporcionar 1–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(5–cloropiridin–3–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (6.9 mg, 34.09%). LC/MS (ESI, m/z), 1105.59 $[M+H]^+$.

[1051] 1H RMN (400 MHz, METANOL–d4) d ppm 0.88 (s, 12 H) 1.17 – 1.31 (m, 4 H) 1.43 – 1.57 (m, 8 H) 1.61 – 1.70 (m, 1 H) 1.80 (d, J=1.25 Hz, 5 H), 1.92 – 2.01 (m, 1 H) 2.14 – 2.20 (m, 2 H) 2.32 – 2.42 (m, 1 H) 2.48 – 2.59 (m, 2 H) 2.96 – 3.14 (m, 3 H) 3.38 (s, 10 H) 3.36 – 3.36 (m, 1 H) 3.38 – 3.40 (m, 3 H) 3.67 – 3.75 (m, 1 H) 4.03 – 4.07 (m, 1 H) 4.37 – 4.42 (m, 1 H) 4.97 – 5.01 (m, 2 H) 5.04 – 5.11 (m, 1 H) 5.35 – 5.51 (m, 2 H) 6.46 – 6.52, (m, 1 H) 6.69 (s, 2 H) 7.18 – 7.26 (m, 2 H) 7.45 – 7.54 (m, 2 H) 7.68 – 7.74 (m, 1 H) 8.29 – 8.34 (m, 2 H).

ADL1–D29

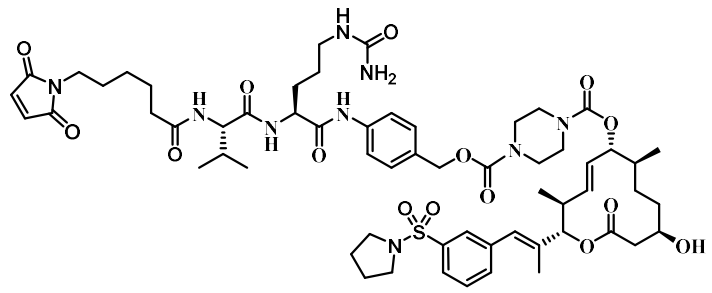


[1052] 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (8.62 mg, 0.012 mmol) y (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–(dimetilamino)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (6 mg, 0.012 mmol) se disolvieron en DMF (118 µl, 1.518 mmol) y base de Hunig (6.12 µl, 0.035 mmol). La mezcla de reacción se agitó a rt hasta el día siguiente. El solvente se evaporó y se purificó por HPLC en fase inversa para proporcionar 1–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–

(3–(dimetilamino)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (4.0 mg, 30.79%). LC/MS (ESI, m/z), 1112.59 $[M+H]^+$.

[1053] ^{1}H RMN (400 MHz, METANOL–d_4) δ ppm 0.87 (s, 12 H) 1.17 – 1.23 (m, 3 H) 1.26 – 1.32 (m, 1 H) 1.44 – 1.57 (m, 8 H) 1.63 – 1.69 (m, 1 H) 1.74 – 1.81 (m, 4 H) 1.83 – 1.88 (m, 1 H) 1.93 – 2.03 (m, 1 H) 2.13 – 2.20 (m, 2 H) 2.34 – 2.42 (m, 1 H) 2.48 – 2.57 (m, 2 H) 2.81 (s, 5 H) 2.98 – 3.05 (m, 2H) 3.08 – 3.14 (m, 1 H) 3.38 (br s, 9 H) 3.65 – 3.75 (m, 1 H) 4.03 – 4.07 (m, 1 H) 4.35 – 4.43 (m, 1 H) 4.44 – 4.52 (m, 1 H) 4.96 – 5.01 (m, 2 H) 5.02 – 5.08 (m, 1 H) 5.34 – 5.51 (m, 2 H) 6.43 – 6.48 (m, 1 H) 6.51 – 6.61 (m, 3 H) 6.69 (s, 2 H) 7.03 – 7.10 (m, 1 H) 7.20 – 7.26 (m, 2 H) 7.46 – 7.51 (m, 2H).

ADL1–D35

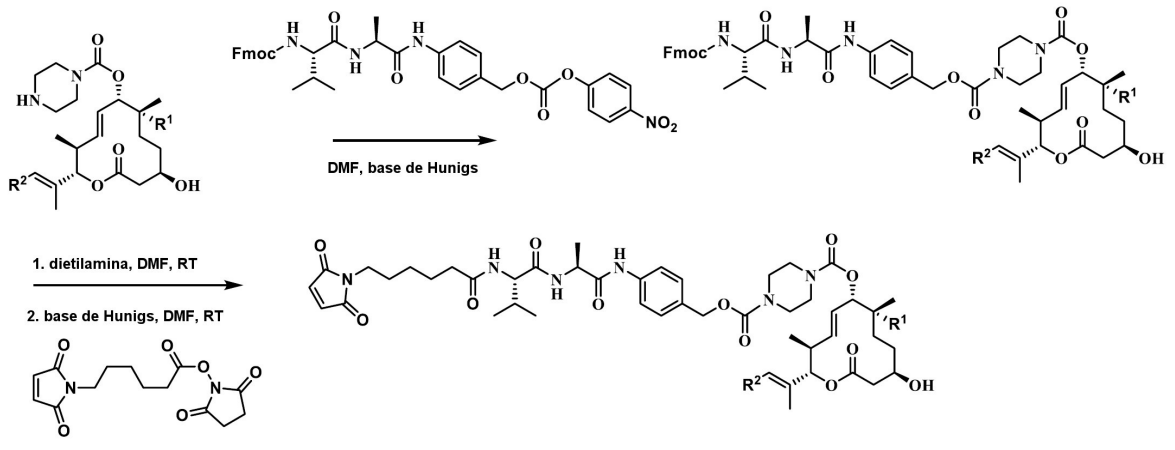


[1054] 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (9.78 mg, .013 mmol) y (2S,3S,6R,7S,10R,E)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxo–2–((E)–1–(3–(pirrolidin–1–ilsulfonil)fenil)prop–1–en–2–il)oxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (8 mg, 0.013 mmol) se disolvieron en DMF (133 µl, 1.722 mmol) y se agregó base de Hunig (6.94 µl, 0.04 mmol) [dos gotas]. La mezcla resultante se agitó a rt hasta el día siguiente, se concentró al vacío y se purificó por HPLC en fase inversa para proporcionar el producto 1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil) 4–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxo–2–((E)–1–(3–(pirrolidin–1–ilsulfonil)fenil)prop–1–en–2–il)oxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (8.2 mg, 51.47%). LC/MS (ESI, m/z), 1203.53 $[M+H]^+$.

[1055] 1H RMN (400 MHz, METANOL–d4) d ppm 0.85 – 0.93 (m, 12 H) 1.17 – 1.34 (m, 4 H) 1.42 – 1.57 (m, 8 H) 1.61 – 1.69 (m, 5 H) 1.79 (s, 4 H) 1.83 – 1.90 (m, 1 H) 1.94 – 2.03 (m, 1 H) 2.12 – 2.20 (m, 2 H) 2.33 – 2.43 (m, 1 H) 2.48 – 2.59 (m, 2 H) 2.96 – 3.05 (m, 2 H) 3.06 – 3.17 (m, 6 H) 3.31 –3.41 (m, 10 H) 3.67 – 3.77 (m, 1 H) 4.02 – 4.10 (m, 1 H) 4.36 – 4.43 (m, 1 H) 4.96 – 5.02 (m, 2 H) 5.04 – 5.11 (m, 1 H) 5.35 – 5.51 (m, 2 H) 6.59 (s, 1H) 6.69 (s, 2 H) 7.20 – 7.27 (m, 2 H) 7.45 – 7.52 (m, 4 H) 7.58 – 7.65 (m, 2 H).

1.4 Preparación de enlazador–carga útil de MC–Val–Ala–pABC

1.4.1 Descripción general



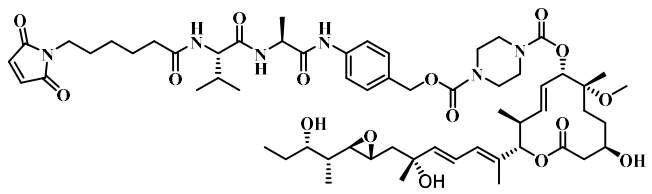
Esquema 5

[1056] Paso 1: Se combinaron carga útil Macrocycle (1.0 equiv.), DMF (0.1 M), (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–3–metil–1–(((S)–1–((4–((((4–nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)–1–oxopropan–2–il)amino)–1–oxobutan–2–il)carbamato (1.5 equiv.; preparado usando el procedimientos descrito en WO 2012/153193) y base de Hunig (3.0 equiv.) y se agitaron hasta el día siguiente. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y se cromatografió para proporcionar fmocVal–Ala–pABC–carga útil.

[1057] Paso 2: Se combinaron carga útil de amonio fmoc–Val–Ala–pABC (1.0 equiv.), disuelta en DMF (0.1 M), y dietilamina (10 equiv.), y se agitaron durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad bajo alto vacío. El producto en bruto se disolvió en DMF (0.1 M), y se agregó base de Hunig (2 equiv.), tras lo cual se agregó 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (3 equiv.) y se agitó hasta el día siguiente. La mezcla de reacción luego se concentró hasta la sequedad y se cromatografió (0–30% MeOH en DCM) para proporcionar la MC–Val–Ala–pABC–carga útil deseada.

1.4.1.1 ADL6–D1

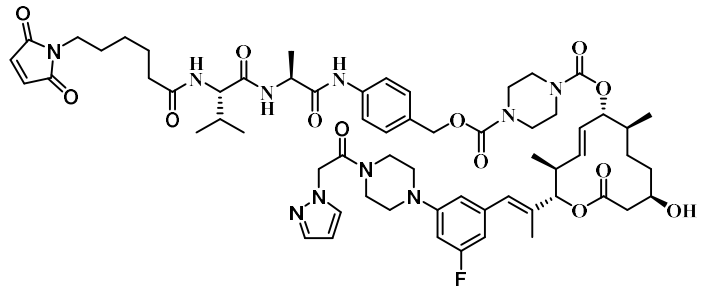
[1058] Esquema 5 – Paso 1: Se siguió el procedimiento general descrito antes (sección 1.4.1) para proporcionar 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil) 4–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (32 mg, 0.027 mmol, 27.9 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), $[M+Na]^+$ 1200.5.



[1059] Esquema 5 – Paso 2: Se siguió el procedimiento general descrito antes (sección 1.4.1) para proporcionar 1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil) 4–((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) piperazin–1,4–dicarboxilato (24 mg, 0.021 mmol, 77 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1149.2 $[M+H]^+$.

[1060] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.85 – 1.02 (m, 16 H), 1.20 – 1.23 (m, 3 H) 1.23 – 1.32 (m, 3 H) 1.34 (s, 3 H) 1.41 – 1.46 (m, 4 H) 1.46 – 1.72 (m, 11 H) 1.78 (s, 3 H) 1.87 (dd, J=14.05, 5.40 Hz, 1 H) 2.08 (dq, J=13.77, 6.83 Hz, 1 H) 2.27 (t, J=7.40 Hz, 2 H) 2.43 – 2.63 (m, 3 H) 2.64 – 2.70 (m, 1 H) 2.90 (td, J=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.32 – 3.33 (m, 4 H) 3.42 – 3.57 (m, 11 H) 3.82 (br dd, J=8.66, 3.89 Hz, 1 H) 4.15 (d, J=7.15 Hz, 1 H), 4.47 (q, J=7.15 Hz, 1 H) 4.99 – 5.12 (m, 4 H) 5.57 (dd, J=15.18, 9.79 Hz, 1 H) 5.69 – 5.78 (m, 1 H) 5.87 (d, J=15.18 Hz, 1 H) 6.13 (d, J=10.92 Hz, 1 H), 6.53 (dd, J=15.31, 10.92 Hz, 1 H) 6.78 (s, 2 H) 7.32 (d, J=8.53 Hz, 2 H) 7.58 (d, J=8.53 Hz, 2 H).

1.4.1.2 ADL6–D16



[1061] Esquema 5 – Paso 1: Se siguió el procedimiento general descrito antes (sección 1.4.1) para proporcionar 1–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–(4–(2–(1H–pirazol–1–il)acetil)piperazin–1–il)–5–fluorofenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (0.060 g, 0.049 mmol, 60.8 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1223.68 [M+H].

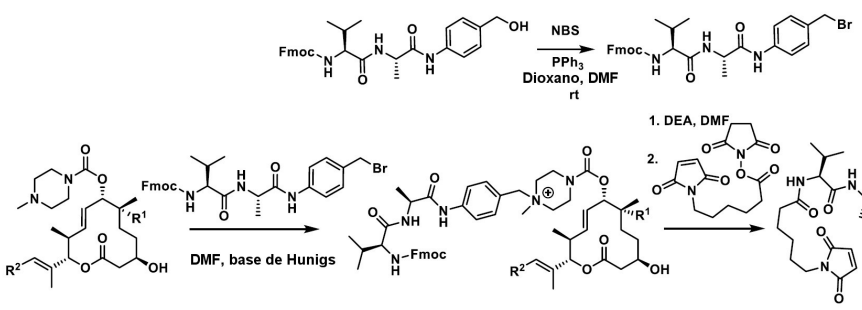
[1062] Esquema 5 – Paso 2: Se siguió el procedimiento general descrito antes (sección 1.4.1) para proporcionar 1–((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–(4–(2–(1H–pirazol–1–il)acetil)piperazin–1–il)–5–fluorofenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il) 4–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–

1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil) piperazin–1,4–dicarboxilato (11.50 mg, 9.64 µmol, 12.05 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z),1194.82 $[M+H]^+$.

[1063] ^{1}H–RMN (400 MHz, $CHCl_3$–*d*): δ ppm 0.97 (br d, J=1.25 Hz, 12 H), 1.24 – 1.41 (m, 5 H), 1.41 – 1.47(m, 3 H), 1.52 – 1.69 (m, 6 H), 1.84 – 1.90 (m, 3 H), 1.92 – 2.01 (m, 1 H), 2.02 – 2.16 (m, 1 H), 2.23 – 2.30 (m, 2 H), 2.42 – 2.51 (m, 1 H), 2.57 – 2.65 (m, 2 H), 3.19 – 3.28 (m, 4 H), 3.35 (s, 4 H), 3.40 – 3.54 (m, 11 H), 3.69 – 3.77 (m, 4 H), 3.78 – 3.85 (m, 1 H), 4.12 – 4.18 (m, 1 H), 4.43 – 4.51 (m, 1 H), 5.07 – 5.16 (m, 3 H), 5.20 (s, 2 H), 5.42 – 5.62 (m, 2 H), 6.29 – 6.38 (m, 1 H), 6.46 – 6.58 (m, 2 H), 6.59 – 6.68 (m, 2 H), 7.28 – 7.37 (m, 2 H), 7.50 – 7.67 (m, 4 H).

1.5 Preparación de enlazador–carga útil de MC–Val–Ala–pAB

1.5.1 Descripción general



Esquema 6

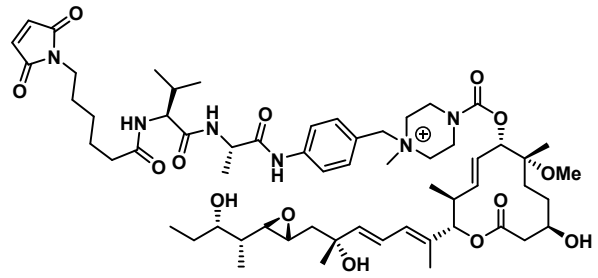
[1064] Paso 1: Se combinaron (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–1–(((S)–1–((4–(hidroximetil)fenil)amino)–1–oxopropan–2–il)amino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)carbamato (0.5 g, 0.97 mmol), 1,4–dioxano (9.70 ml, 0.97 mmol), trifenilfosfina (0.509 g, 1.939 mmol), N–bromosuccinimida (0.345 g, 1.939 mmol) y DMF (2.424 ml, 0.97 mmol) y se agitaron durante 3 horas a RT. La mezcla de reacción se concentró y se cromatografió para proporcionar (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–1–(((S)–1–((4–(bromometil)fenil)amino)–1–oxopropan–2–il)amino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)carbamato (116 mg, 0.201 mmol, 20.68 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 580.14 [M+H].

[1065] Paso 2: La carga útil (1.0 equiv.), (9H–fluoren–9–il)metil ((S)–1–(((S)–1–((4–(bromometil)fenil)amino)–1–oxopropan–2–il)amino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)carbamato (0.069 g, 0.12 mmol), N,N–dimetilformamida (0.1 M) y base de Hunig (1.5 equiv.) se combinaron y se agitaron hasta el día siguiente. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y se cromatografió (0–10% MeOH en DCM) para proporcionar la carga útil de amonio cuaternario fmoc–Val–Ala–pAB.

[1066] Paso 3: La carga útil de amonio cuaternario fmoc–Val–Ala–pAB (1.0 equiv.), disuelta en DMF (0.1 M), y dietilamina (10 equiv.) se combinaron y se agitaron durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad bajo alto vacío. El producto en bruto se disolvió en DMF (0.1 M) y se agregó base de Hunig (2 equiv.), tras lo

cual se agregó 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (3 equiv.) y se agitó hasta el día siguiente. La mezcla de reacción luego se concentró hasta la sequedad y se cromatografió (0–30% MeOH en DCM) para proporcionar el enlazador–carga útil de amonio cuaternario deseado.

1.5.1.1 ADL5–D2



[1067] Esquema 6 – Paso 2: Bromuro de 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (30 mg, 0.024 mmol, 26.5 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1149.77 $[M+H]^+$.

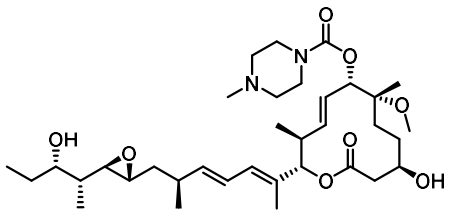
[1068] Esquema 6 – Paso 3: Monobromuro de mono(1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–ium–2–ilio) (4.8 mg, 15.33 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1120.99 $[M+H]^+$.

[1069] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.88 (s, 15 H), 1.09 – 1.26 (m, 9 H), 1.31 – 1.58 (m, 14 H), 1.42 – 1.44 (m, 1 H), 1.68 (s, 3 H), 1.73 – 1.81 (m, 1 H), 1.91 – 2.03 (m, 1 H), 2.14 – 2.22 (m, 2 H), 2.35 – 2.52 (m, 3 H), 2.53 – 2.60 (m, 1 H), 2.74 – 2.83 (m, 1 H), 2.97 (s, 3 H), 3.25 (s, 1 H), 3.28 – 3.46 (m, 8 H), 3.52 – 3.66 (m, 2 H), 3.70 – 3.78 (m, 1 H), 3.97 – 4.11 (m, 3 H), 4.32 – 4.41 (m, 1 H), 4.45 – 4.54 (m, 2 H), 4.91 – 5.01 (m, 2 H), 5.44 – 5.55 (m, 1 H), 5.57 – 5.70 (m, 1 H), 5.72 – 5.82 (m, 1 H), 6.00 – 6.08 (m, 1 H), 6.43 (dd, J=15.25, 10.98 Hz, 1 H), 6.69 (s, 2 H), 7.36 – 7.47 (m, 2 H), 7.67 –7.75 (m, 2 H).

1.5.1.2 ADL5–D19

[1070] Se empleó el procedimiento general descrito antes (sección 1.5.1) para sintetizar ADL5–D19. La carga útil D19 se sintetizó usando procedimientos descritos en la sección 1.2.1.

D19



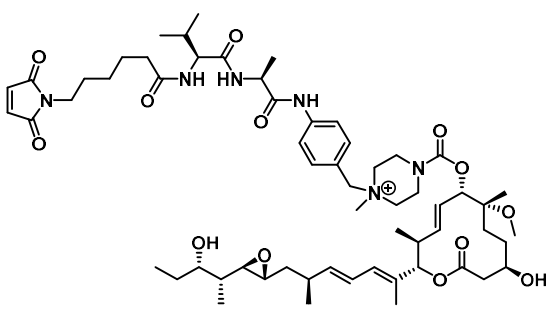
[1071] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((S,2E,4E)–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–metilpiperazin–1–carboxilato (114.2 mg, 0.180 mmol, 82 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 635.8 [M+H].

[1072] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.88 – 1.00 (m, 9 H) 1.10 (d, *J*=6.65 Hz, 3 H) 1.16 – 1.27 (m, 4 H) 1.40 – 1.70 (m, 8 H) 1.77 (d, *J*=0.88 Hz, 3 H) 2.28 – 2.36 (m, 3 H) 2.42 (br t, *J*=5.08 Hz, 3 H) 2.47 – 2.61 (m, 4 H) 2.68 (dd, *J*=8.22, 2.20 Hz, 1 H) 2.74 (td, *J*=5.99, 2.20 Hz, 1 H) 3.13 –3.17 (m, 1 H) 3.34 – 3.38 (m, 3 H) 3.47 – 3.58 (m, 5 H) 3.81 – 3.87 (m, 1 H) 5.01 – 5.10 (m, 2 H) 5.54 – 5.81 (m, 3 H) 6.06 – 6.15 (m, 1 H) 6.34 (dd, *J*=15.00, 10.98 Hz, 1 H).

[1073] 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((S,2E,4E)–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (25 mg, 45.6%). LC/MS (ESI, m/z), 1133.1 $[M+]^{+}$.

[1074] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.94 (br dd, *J*=18.45, 7.15 Hz, 18 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.25 (s, 4 H) 1.28 – 1.35 (m, 1 H) 1.46 (br d, *J*=7.03 Hz, 9 H) 1.59 – 1.70 (m, 2 H) 1.77 (s, 3 H) 2.05 – 2.12 (m, 1 H) 2.44 – 2.60 (m, 4 H) 2.63 – 2.72 (m, 1 H) 2.70 – 2.77 (m, 1 H) 3.06 (s, 3 H) 3.40 – 3.44 (m, 1 H) 3.50 (br d, *J*=1.63 Hz, 4 H) 3.64 – 3.75 (m, 1 H) 3.80 – 3.88 (m, 1 H) 3.91 – 3.99 (m, 1 H) 4.04 – 4.20 (m, 1 H) 4.21 – 4.28 (m, 1 H) 4.37 – 4.43 (m, 1 H) 4.59 (br s, 2 H) 4.93 – 4.95 (m, 2 H) 5.06 – 5.08 (m, 2 H) 5.57 – 5.80 (m, 4 H) 6.05 – 6.16 (m, 1 H) 6.27 – 6.41 (m, 1 H) 7.28 – 7.37 (m, 2 H) 7.38 – 7.45 (m, 2 H) 7.47 – 7.53 (m, 2 H) 7.65 – 7.72 (m, 2 H) 7.74 – 7.86 (m, 4 H).

ADL5–D19



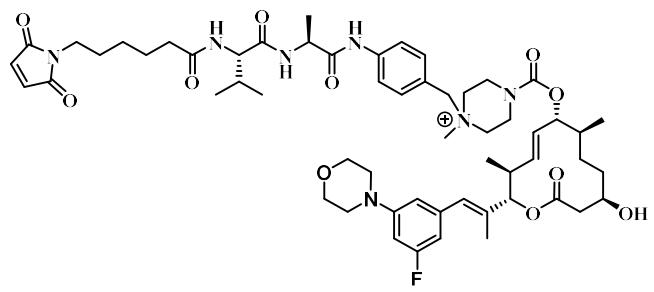
[1075] <u>Enlazador–carga útil (ADL5–D19)</u>: 1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–

((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((S,2E,4E)–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (19.4 mg, 0.018 mmol, 80 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1105.9 [M+H].

[1076] 1–H RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.85 – 1.03 (m, 16 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.17 – 1.27 (m, 4 H) 1.29 – 1.37 (m, 3 H) 1.44 – 1.70, (m, 15 H) 1.74 – 1.80 (m, 3 H) 2.04 – 2.14 (m, 1 H) 2.30 (t, *J*=7.47 Hz, 2 H) 2.44 – 2.61 (m, 4 H) 2.64 – 2.69 (m, 1 H) 2.72 – 2.78 (m, 1 H) 3.09 (s, 3 H) 3.40 – 3.59 (m, 9 H) 3.62 – 3.77 (m, 2 H) 3.82 – 3.89 (m, 1 H) 4.12 – 4.21 (m, 3 H) 4.40 – 4.55 (m, 1 H) 4.56 – 4.66 (m, 3 H) 5.03 – 5.12 (m, 2 H) 5.55 – 5.81 (m, 3 H) 6.06 – 6.16 (m, 1 H) 6.26 – 6.41 (m, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.48 – 7.57 (m, 2 H) 7.78 – 7.86 (m, 2 H).

1.5.1.3 ADL5–D17

[1077] Se empleó el procedimiento general descrito antes (sección 1.5.1) para sintetizar ADL5–D17. La carga útil D17 se sintetizó usando procedimientos descritos en la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2019/026992 (véase, por ejemplo, Procedimiento 2, Procedimiento 3, y Procedimiento 4 o 5), que se incorpora a la presente por referencia.



[1078] Paso 1: 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–morpholinofenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (12.9 mg, 69.8%). LC/MS (ESI, m/z), 1086.43 [M+H].

[1079] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.96 – 1.07 (m, 12 H), 1.27 – 1.42 (m, 3 H), 1.46 (d, J=7.15 Hz, 3 H), 1.62 – 1.72 (m, 2 H), 1.88 (d, J=1.13 Hz, 3 H), 1.97 – 2.06 (m, 1 H), 2.04 – 2.14 (m, 1 H), 2.44 – 2.53 (m, 1 H), 2.58 – 2.69 (m, 2 H), 3.08 (s, 3 H), 3.13 – 3.19 (m, 4 H), 3.38 – 3.56 (m, 4 H), 3.61 – 3.75 (m, 2 H), 3.79 – 3.88 (m, 5 H), 3.90 – 3.98 (m, 1 H), 4.07 – 4.18 (m, 2 H), 4.20 – 4.29 (m, 1 H), 4.35 – 4.45 (m, 2 H), 4.45 – 4.54 (m, 1 H), 4.61 (s, 2 H), 4.86 – 4.92 (m, 2 H), 5.15 (d, J=10.67 Hz, 1 H), 5.46 – 5.65 (m, 2 H), 6.46 – 6.67 (m, 4 H), 7.28 – 7.37 (m, 2 H), 7.37 – 7.45 (m, 2 H), 7.47 – 7.53 (m, 2 H), 7.66 – 7.71 (m, 2 H), 7.74 – 7.84 (m, 4 H).

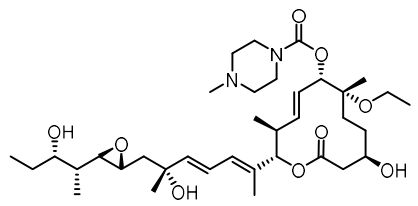
[1080] Paso 2: Bromuro de 1–(4–((R)–2–((R)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–morpholinofenil)prop–1–en–2–il)–10–

hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (7.6 mg, 60.5 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1057.62 [M+H].

[1081] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.95 – 1.08 (m, 12 H), 1.24 – 1.42 (m, 5 H), 1.47 (d, J=7.15 Hz, 3 H), 1.52 – 1.71 (m, 6 H), 1.89 (d, J=1.13 Hz, 3 H), 1.95 – 2.05 (m, 1 H), 2.05 – 2.15 (m, 1 H), 2.26 – 2.34 (m, 2 H), 2.46 – 2.53 (m, 1 H), 2.58 – 2.69 (m, 2 H), 3.07 – 3.12 (m, 3 H), 3.14 –3.19 (m, 4 H), 3.39 – 3.58 (m, 6 H), 3.61 – 3.76 (m, 2 H), 3.80 – 3.86 (m, 5 H), 4.09 – 4.18 (m, 3 H), 4.43 – 4.51 (m, 1 H), 4.62 (s, 2 H), 4.87 – 4.93 (m, 2 H), 5.12 – 5.19 (m, 1 H), 5.46 – 5.65 (m, 2 H), 6.47 – 6.66 (m, 4 H), 6.80 (s, 2 H), 7.53 (d, J=8.66 Hz, 2 H), 7.82 (d, J=8.66 Hz, 2 H).

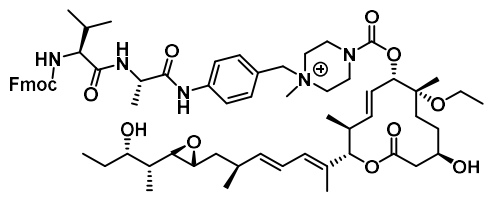
1.5.1.4 ADL5–D10

[1082] Se empleó el procedimiento general descrito antes (sección 1.5.1) para sintetizar ADL5–D10. La carga útil D10 se sintetizó usando procedimientos descritos en la sección 1.2.1.



[1083] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–etoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–metilpiperazin–1–carboxilato (16.6 mg, 0.025 mmol, 38.7 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 665.7 $[M+H]^+$.

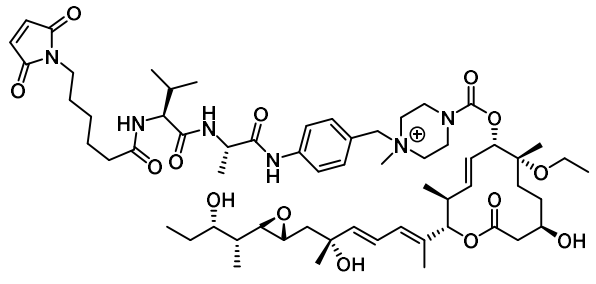
[1084] ^{1}H–RMN (400 MHz, METANOL–*d*): δ ppm 0.76 – 0.87 (m, 9 H), 1.03 – 1.09 (m, 3 H), 1.10 – 1.13 (m, 3 H) 1.13 – 1.19 (m, 1 H) 1.20 – 1.27 (m, 3 H), 1.29 – 1.48 (m, 6 H) 1.51 – 1.59 (m, 1 H) 1.65 – 1.71 (m, 3 H) 1.73 – 1.81 (m, 1 H) 2.20 (s, 3 H), 2.27 – 2.34 (m, 4 H) 2.34 – 2.44 (m, 2 H) 2.44 – 2.53 (m, 1 H) 2.53 – 2.59 (m, 1 H) 2.76 – 2.83 (m, 1 H) 3.23 – 3.26 (m, 1 H) 3.34 – 3.52 (m, 7 H) 3.67 – 3.75 (m, 1 H) 4.86 – 4.92 (m, 1 H) 4.92 – 4.99 (m,1 H), 5.41 – 5.51 (m, 1 H), 5.60 – 5.71 (m, 1 H), 5.72 – 5.82 (m, 1 H), 6.00 – 6.07 (m, 1 H), 6.37 – 6.48 (m, 1 H)



[1085] Paso 1: 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–etoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (18.6 mg, 0.016 mmol, 87 % de rendimiento) en forma de barniz

incoloro. LC/MS (ESI, m/z), 1163.01 $[M]^+$.

[1086] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.86 – 1.03 (m, 16 H), 1.20 (s, 3 H), 1.25 (s, 4 H), 1.36 (s, 3 H), 1.43 – 1.72 (m, 10 H), 1.81 (s, 3 H), 1.84 –1.92 (m, 1 H), 2.06 – 2.14 (m, 1 H), 2.46 – 2.63 (m, 3 H), 2.67 – 2.72 (m, 1 H), 2.88 – 2.94 (m, 1 H), 3.03 – 3.09 (m, 3 H), 3.38 – 3.45 (m, 3 H), 3.54 (s, 6 H), 3.63 – 3.79 (m, 2 H), 3.81 – 3.88 (m, 1 H), 3.92 – 3.98 (m, 1 H), 4.07 – 4.18 (m, 2 H), 4.21 – 4.28 (m, 1 H), 4.36 – 4.44 (m, 2 H), 4.47 – 4.53 (m, 1 H), 4.55 – 4.63 (m, 3 H), 5.02 – 5.11 (m, 3 H), 5.56 – 5.66 (m, 1 H), 5.75 – 5.84 (m, 1 H), 5.86 – 5.92 (m, 1 H), 6.12 – 6.19 (m, 1 H), 6.49 – 6.61 (m, 1 H), 7.29 – 7.36 (m, 2 H), 7.38 – 7.44 (m, 2 H), 7.47 – 7.53 (m, 2 H), 7.64 – 7.71 (m, 2 H), 7.80 (dd, J=15.06, 7.91 Hz, 4 H).



[1087] Paso 2: 1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–etoxi–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (14.09 mg, 82 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1057.62 $[M+H]^+$.

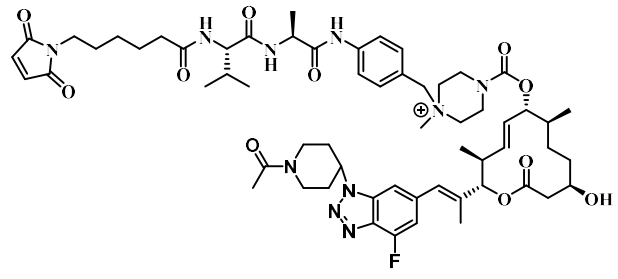
[1088] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.87 – 1.03 (m, 15 H), 1.20 (s, 3 H), 1.22 – 1.29 (m, 4 H), 1.37 (s, 6 H), 1.45 – 1.72 (m, 14 H), 1.81 (s, 3 H), 1.84 – 1.95 (m, 1 H), 2.05 – 2.16 (m, 1 H), 2.26 – 2.36 (m, 2 H), 2.47 – 2.62 (m, 3 H), 2.66 – 2.74 (m, 1 H), 2.86 – 2.95 (m, 1 H), 3.11 (s, 3 H), 3.42 – 3.51 (m, 4 H), 3.51 – 3.62 (m, 5 H), 3.64 – 3.78 (m, 2 H), 3.81 – 3.89 (m, 1 H), 4.09 – 4.20 (m, 3 H), 4.43 – 4.52 (m, 1 H), 4.54 – 4.59 (m, 1 H), 4.55 – 4.67 (m, 2 H), 4.60 – 4.68 (m, 2 H), 5.01 – 5.12 (m, 2 H), 5.54 – 5.65 (m, 1 H), 5.75 – 5.86 (m, 1 H), 5.86 – 5.94 (m, 1 H), 6.10 – 6.21 (m, 1 H), 6.47 – 6.62 (m, 1 H), 6.81 (s, 2 H), 7.49 – 7.60 (m, 2 H) 7.76 – 7.89 (m, 2 H).

1.5.1.5 ADL5–D15

[1089] Se empleó el procedimiento general descrito antes (sección 1.5.1) para sintetizar ADL5–D15. La carga útil D15 se sintetizó usando procedimientos descritos en la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2019/026992, que se incorpora a la presente por referencia**.**

[1090] Paso 1: 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(1–(1–

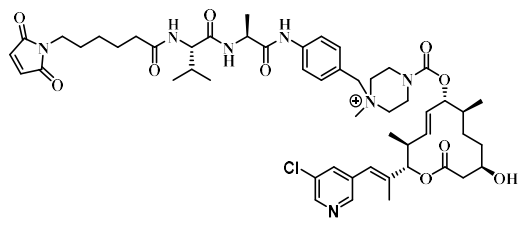
acetilpiperidin–4–il)–4–fluoro–1H–benzo[d][1,2,3]triazol–6–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (100 mg, 0.086 mmol, 57.3 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1167.76 [M+H].



[1091] Paso 2: 4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(1–(1–acetilpiperidin–4–il)–4–fluoro–1H–benzo[d][1,2,3]triazol–6–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–1–metilpiperazin–1–io (32 mg, 0.028 mmol, 32.8 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1138.64 [M+H].

[1092] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.99 (s, 10 H), 1.26 – 1.40 (m, 5 H), 1.42 – 1.49 (m, 3 H), 1.67 (br s, 6 H), 1.96 (d, J=1.00 Hz, 3 H), 2.00 – 2.13 (m, 2 H), 2.16 – 2.42 (m, 7 H), 2.44 – 2.55 (m, 1 H), 2.59 – 2.76 (m, 2 H), 2.98 – 3.26 (m, 4 H), 3.38 – 3.59 (m, 7 H), 3.60 – 3.76 (m, 2 H), 3.78 – 3.90 (m, 1 H), 4.13 (br d, J=7.15 Hz, 3 H), 4.41 – 4.52 (m, 1 H), 4.53 – 4.71 (m, 3 H), 4.89 – 4.97 (m, 1 H), 5.10 – 5.27 (m, 2 H), 5.48 – 5.67 (m, 2 H), 6.79 (s, 2 H) 7.07 – 7.17 (m, 1 H), 7.48 – 7.61 (m, 3 H), 7.78 – 7.84 (m, 2 H).

1.5.1.5 ADL5–D32



[1093] El procedimiento general descrito antes (sección 1.5.1) se empleó para sintetizar ADL5–D32. La carga útil D15 se sintetizó usando procedimientos descritos en la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2019/026992, que se incorpora a la presente por referencia**.**

[1094] Paso 1: 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(5–cloropiridin–3–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (15 mg, 0.015 mmol, 69.6 % de rendimiento) LC/MS (ESI, m/z), 1018.4 $[M]^{+}$

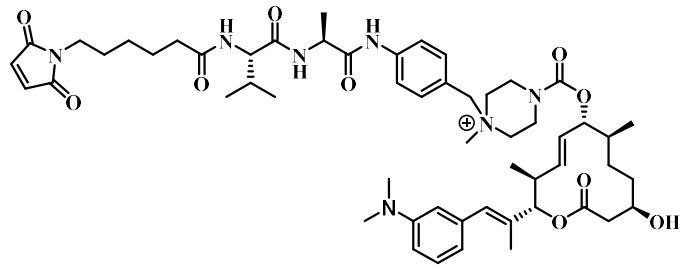
[1095] 1H RMN (400 MHz, METANOL–d4) d ppm 0.99 (s, 14 H) 1.29 – 1.41 (m, 3 H) 1.44 – 1.49 (m, 3 H) 1.61 – 1.71 (m, 2 H) 1.92 (d, J=1.25 Hz, 3 H), 1.95 – 2.13 (m, 2 H) 2.45 –

2.53 (m, 1 H) 2.60 – 2.70 (m, 2 H) 3.04 – 3.09 (m, 3 H) 3.37 (s, 3 H) 3.39 – 3.47 (m, 1 H) 3.47 – 3.54 (m, 2 H) 3.61 – 3.75, (m, 2 H) 3.78 – 3.87 (m, 1 H) 3.93 – 3.99 (m, 1 H) 4.08 – 4.18 (m, 2 H) 4.22 – 4.29 (m, 1 H) 4.39 – 4.45 (m, 2 H) 4.45 – 4.53 (m, 1 H) 4.56 – 4.63 (m,3 H) 5.17 – 5.23 (m, 1 H) 5.48 – 5.64 (m, 2 H) 6.57 – 6.64 (m, 1 H) 7.28 – 7.36 (m,2 H) 7.37 – 7.45 (m, 2 H) 7.47 – 7.54 (m, 2 H) 7.64 – 7.70 (m, 2H) 7.75 – 7.84 (m, 5 H) 8.41 – 8.48 (m, 2 H)

[1096] Paso 2: 4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(5–cloropiridin–3–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–1–metilpiperazin–1–io (6.2 mg, 42.5 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 990.34 [M+H].

[1097] 1H RMN (400 MHz, METANOL–d4) d ppm 0.97 – 1.09 (m, 12 H) 1.24 – 1.41 (m, 5 H) 1.47 (d, J=7.15 Hz, 3 H) 1.55 – 1.71 (m, 6 H) 1.92 (d, J=1.13 Hz, 3 H) 1.98 – 2.15 (m, 2 H) 2.27 – 2.36 (m, 2 H) 2.46 – 2.53 (m, 1 H) 2.60 – 2.71 (m, 2 H) 3.06 – 3.13 (m, 3 H) 3.35 – 3.38 (m, 1 H) 3.41 – 3.58 (m, 6 H) 3.62 – 3.76 (m, 2 H) 3.80 – 3.88 (m, 1 H) 4.08 – 4.19 (m, 3 H) 4.43 – 4.52 (m, 1 H) 4.57 – 4.66 (m, 2 H) 5.16 – 5.24 (m, 1 H) 5.49 – 5.68, (m, 2 H) 6.62 (s, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.49 – 7.57 (m, 2 H) 7.76 – 7.87 (m, 3 H) 8.39 – 8.49 (m, 2 H).

1.5.1.5 ADL5–D30



[1098] El procedimiento general descrito antes (sección 1.5.1) se empleó para sintetizar ADL5–D30. La carga útil D30 se sintetizó usando procedimientos descritos en la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2019/026992, que se incorpora a la presente por referencia**.**

[1099] Paso 1: 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–(dimetilamino)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (16 mg, 0.016 mmol, 51.4% de rendimiento) LC/MS (ESI, m/z), 1027.50 $[M+H]^+$

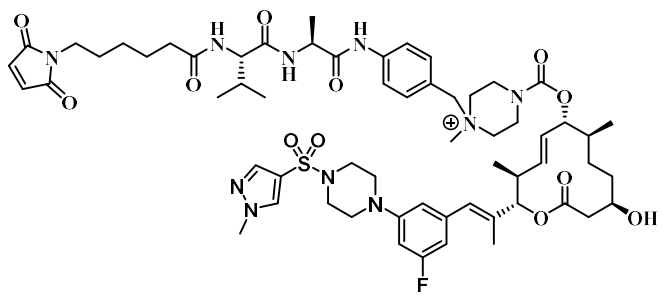
[1100] 1H RMN (400 MHz, METANOL–d_4) d ppm 0.95 – 1.07 (m, 13 H) 1.31 – 1.42 (m, 2 H) 1.44 – 1.50 (m, 3 H) 1.63 – 1.71 (m, 2 H) 1.84 – 1.92 (m, 3H) 1.98 – 2.14 (m, 2 H) 2.47 – 2.56 (m, 1 H) 2.60 – 2.67 (m, 2 H) 2.93 (s, 6 H) 3.03 – 3.09 (m, 3 H) 3.37 (s, 4 H) 3.47 – 3.56 (m, 2 H) 3.63 – 3.75 (m, 2 H) 3.79 – 3.88 (m, 1 H) 3.92 – 3.98 (m, 1 H) 4.08 – 4.19 (m,

2 H) 4.21 – 4.27 (m, 1 H) 4.37 – 4.44 (m, 2 H) 4.45 – 4.54 (m, 1 H) 4.57 – 4.62 (m, 2H) 4.91 – 4.94 (m, 2 H) 5.15 – 5.20 (m, 1 H) 5.47 – 5.55 (m, 1 H) 5.56 – 5.65 (m, 1 H) 6.58 (s, 1 H) 6.67 (d, J=1.51 Hz, 3 H) 7.15 – 7.24 (m, 1 H), 7.28 – 7.36 (m, 2 H) 7.38 – 7.45 (m, 2 H) 7.47 – 7.54 (m, 2 H) 7.64 – 7.73 (m, 2 H) 7.75 – 7.85 (m, 4 H).

[1101] Paso 2: 4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(5–cloropiridin–3–il)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–1–metilpiperazin–1–io (6.2 mg, 42.5 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 990.34 [M+H].

[1102] 1H RMN (400 MHz, METANOL–d4) d ppm 0.88 (d, J=6.65 Hz, 12 H) 1.16 – 1.30 (m, 4 H) 1.32 – 1.38 (m, 3 H) 1.43 – 1.58 (m, 6 H) 1.75 – 1.80, (m, 3 H) 1.84 – 1.92 (m, 1 H) 1.93 – 2.02 (m, 1 H) 2.14 – 2.21 (m, 2 H) 2.35 – 2.42 (m, 1 H) 2.48 – 2.57 (m, 2 H) 2.82 (s, 6 H) 2.94 – 3.02 (m, 3 H), 3.27 – 3.32 (m, 1 H) 3.35 – 3.45 (m, 4 H) 3.50 – 3.64 (m, 2 H) 3.68 – 3.76 (m, 1 H) 3.97 – 4.07 (m, 3 H) 4.31 – 4.40 (m, 1 H) 4.47 – 4.53 (m, 2 H) 5.03–5.09 (m, 1 H) 5.35 – 5.44 (m, 1 H) 5.45 – 5.55 (m, 1 H) 6.42 – 6.50 (m, 1 H) 6.51 – 6.62 (m, 3 H) 6.69 (s, 2 H) 7.03 – 7.12 (m, 1 H) 7.38 – 7.44 (m, 2H) 7.66 – 7.75 (m, 2 H) 8.42 – 8.47 (m, 1 H).

1.5.1.5 ADL5–D27



[1103] El procedimiento general descrito antes (sección 1.5.1) se empleó para sintetizar ADL5–D27. La carga útil D27 se sintetizó usando procedimientos descritos en la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2019/026992, que se incorpora a la presente por referencia.

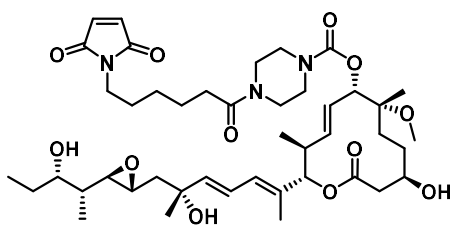
[1104] Paso 1: 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–((1–metil–1H–pirazol–4–il)sulfonil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (25.2 mg, 0.020 mmol, 83% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1230.54 $[M+H]^+$

Paso 2: 1–(4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–((1–metil–1H–pirazol–4–il)sulfonil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–

metilpiperazin–1–io (5.2 mg, 4.33 µmol, 21.13 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1201.68 $[M+H]^+$

[1105] ^{1}H RMN (400 MHz, METANOL–*d*$_4$) d ppm 0.87 (d, J=6.78 Hz, 12 H) 1.13 – 1.29 (m, 4 H) 1.31 – 1.38 (m, 3 H) 1.43 – 1.59 (m, 6 H) 1.71 – 1.79, (m, 3 H) 1.83 – 2.02 (m, 2 H) 2.14 – 2.21 (m, 2 H) 2.34 – 2.41 (m, 1 H) 2.56 (s, 8 H) 2.94 – 3.01 (m, 3 H) 3.12 – 3.18 (m, 8 H) 3.28 – 3.45 (m, 5 H), 3.48 – 3.63 (m, 2 H) 3.70 (s, 4 H) 3.97 – 4.07 (m, 3 H) 4.29 – 4.41 (m, 1 H) 4.49 (s, 2 H) 4.98 – 5.06 (m, 1 H) 5.34 – 5.54 (m, 2 H) 6.37 – 6.45 (m, 2H) 6.51 (s, 2 H) 6.69 (s, 2 H) 7.37 – 7.43 (m, 2 H) 7.63 – 7.73 (m, 4 H).

1.5.1.6 ADL10–D1

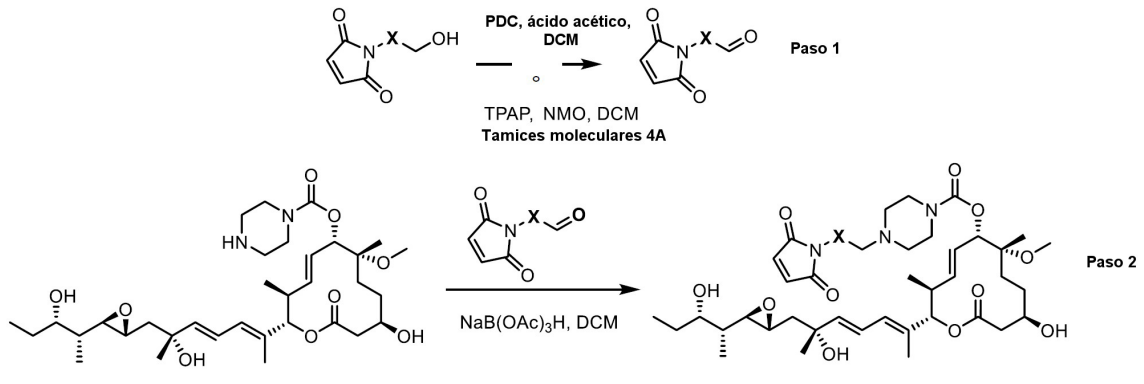


[1106] Se combinaron (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (0.012 g, 0.019 mmol), 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (0.012 g, 0.038 mmol) y DCM (0.188 ml, 0.019 mmol) y se agitaron hasta el día siguiente. La mezcla se cargó directamente en una columna de gel de sílice y se cromatografió para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoil)piperazin–1–carboxilato (8.4 mg, 10.12 µmol, 53.7 % de rendimiento). LC/MS [M+Na] 853.5.

[1107] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.89 (s, 9 H) 1.21 – 1.39 (m, 9 H) 1.41 – 1.56 (m, 5 H) 1.57 – 1.71 (m, 6 H) 1.69 – 1.71 (m, 1 H) 1.79, (d, J=0.88 Hz, 3 H) 1.82 – 1.90 (m, 1 H) 2.34 – 2.43 (m, 1 H) 2.41 – 2.41 (m, 1 H) 2.46 – 2.63 (m, 3 H) 2.65 – 2.68 (m, 2 H) 2.68 (s, 3 H) 2.86 – 2.92 (m, 1 H) 3.33 (s, 3 H) 3.51 (br d, J=7.03 Hz, 6 H) 3.54 – 3.60 (m, 5 H) 3.77 – 3.88 (m, 1 H) 5.06 (s, 2 H) 5.53 – 5.63 (m, 1 H) 5.70 – 5.80 (m, 1 H), 5.83 – 5.94 (m, 1 H) 6.08 – 6.19 (m, 1 H) 6.47 – 6.59 (m, 1 H) 6.80 (s, 2 H).

1.6 Preparación de ADL12–D1, ADL14–D1 y ADL15–D1

1.6.1 Descripción general – Procedimiento general 1



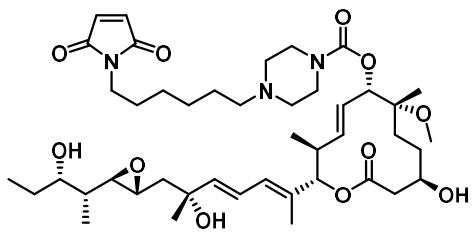
Esquema 7

[1108] Para ADL12–D1 – **Paso 1**: A una solución agitada de 1–(6–hidroxihexil)–1H–pirrol–2,5–diona (0.200 g, 1.014 mmol) en DCM (20.28 ml, 1.014 mmol) se agregó PDC (3.81 g, 10.14 mmol) y ácido acético (0.1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a RT. La mezcla de reacción luego se filtró a través de un taco de sílice y se concentró hasta la sequedad para proporcionar 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanal (40 mg, 0.205 mmol, 20.21 % de rendimiento).

[1109] Para ADL14–D1 y ADL15–D1 – **Paso 1**: A una solución agitada de alcohol maleimida (1.0 equiv.) en DCM (0.05 M) se agregó MS–4A en polvo pre–activado, 2.6 mg por 1 mg de alcohol, N–metilmorfolina–N–óxido (1.2 equiv.) y TPAP (0.1 equiv.) en ese orden. La mezcla de reacción se agitó durante 60 minutos a RT. La mezcla de reacción luego se filtró a través de un taco de gel de sílice y se concentró hasta la sequedad. El producto no purificado se llevó al siguiente paso (Paso 2).

[1110] Paso 2: (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il piperazin–1–carboxilato (1.0 equiv.), 2–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)acetaldehído (2.0–3.0 equiv.), DCM (0.1 M), triacetoxiborohidruro de sodio (3.0 equiv.) se mezclaron y se agitaron durante 10 minutos. La mezcla de reacción se cargó luego directamente en una columna de gel de sílice y se cromatografió para proporcionar el enlazador–carga útil deseado.

1.6.1.1 ADL12–D1

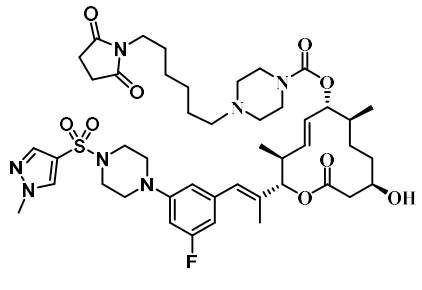


[1111] Enlazador–carga útil (ADL12–D1): Se empleó el procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 para sintetizar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(6–(2,5–dioxo–2,5–

dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)piperazin–1–carboxilato (41 mg, 0.050 mmol, 80 % de rendimiento). LC/MS $[M+]^+$ 816.75.

[1112] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.86 – 0.98 (m, 9 H) 1.20 – 1.23 (m, 3 H) 1.23 – 1.40 (m, 8 H) 1.41 – 1.70 (m, 12 H) 1.79 (d, J=0.63 Hz, 3 H) 1.83 – 1.91 (m, 1 H) 2.33 – 2.40 (m, 2 H) 2.43 (br t, J=4.77 Hz, 4 H) 2.48 – 2.64 (m, 3 H) 2.65 – 2.69 (m, 1 H) 2.87 – 2.92 (m, 1 H) 3.32 (s, 3 H) 3.41 – 3.60 (m, 7 H) 3.79 – 3.87 (m, 1 H) 5.04 (dd, J=19.39, 10.23 Hz, 2 H) 5.57 (dd, J=15.18, 9.79 Hz, 1 H) 5.69 – 5.79 (m, 1 H) 5.87 (d, J=15.31 Hz, 1 H) 6.11 – 6.17 (m, 1 H) 6.49 – 6.58 (m, 1 H) 6.80 (s, 2 H).

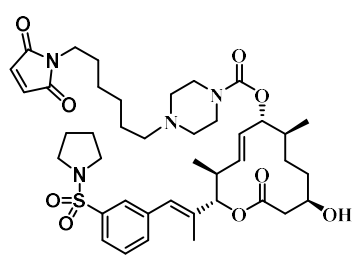
1.6.1.X ADL12–D28



[1113] Enlazador–carga útil (ADL12–D28): El procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 se empleó para sintetizar (2S,3S,6R,7S,10R,E)–2–((E)–1–(3–fluoro–5–(4–((1–metil–1H–pirazol–4–il)sulfonil)piperazin–1–il)fenil)prop–1–en–2–il)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)piperazin–1–carboxilato (2.3 mg, 30.7%). LC/MS $[M+]^+$ 897.32

[1114] ^{1}H RMN (400 MHz, METANOL–d_4) δ ppm 0.85 – 0.93 (m, 6 H) 1.16 – 1.34 (m, 6 H) 1.37 – 1.58 (m, 6 H) 1.72 – 1.77 (m, 3 H) 1.80 – 1.88 (m, 1 H), 2.23 – 2.41 (m, 7 H) 2.47 – 2.57 (m, 2 H) 3.08 – 3.19 (m, 9 H) 3.33 – 3.42 (m, 5 H) 3.70 (s, 4 H) 4.67 – 4.72 (m, 1 H) 4.98 – 5.07 (m, 1 H) 5.33 – 5.50 (m, 2 H) 6.36 – 6.43 (m, 2 H) 6.44 – 6.53 (m, 2 H) 6.70 (s, 2 H) 7.62 – 7.69 (m, 2 H)

1.6.1.X ADL12–D35

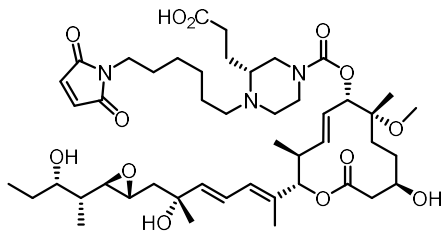


[1115] Enlazador–carga útil (ADL12–D35): El procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 se empleó para sintetizar (2S,3S,6R,7S,10R,E)–10–hidroxi–3,7–dimetil–12–oxo–2–((E)–1–(3–(pirrolidin–1–ilsulfonil)fenil)prop–1–en–2–il)oxaciclododec–4–en–6–il 4–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)piperazin–1–carboxilato (4.0 mg, 5.11 µmol, 28.8 % de rendimiento). LC/MS $[M+H]^+$ 783.5

[1116] 1H RMN (400 MHz, METANOL–*d*4) d ppm 0.91 (dd, *J*=6.78, 2.51 Hz, 6 H) 1.17 – 1.33 (m, 6 H) 1.38 – 1.59 (m, 6 H) 1.65 (s, 4 H) 1.80 (s, 3 H), 1.82 – 1.91 (m, 1 H) 2.23

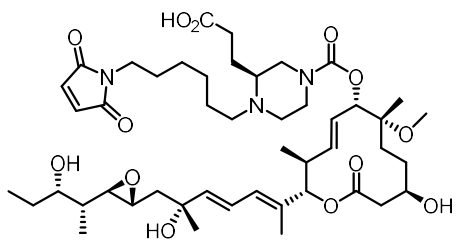
– 2.41 (m, 7 H) 2.49 – 2.61 (m, 2 H) 3.14 (s, 4 H) 3.38 (br d, *J*=7.15 Hz, 6 H) 3.67 – 3.76 (m, 1 H) 4.68 – 4.73 (m, 1 H) 5.03 – 5.11 (m, 1 H) 5.34 – 5.52 (m, 2 H) 6.55 – 6.62 (m, 1 H) 6.70 (s, 2 H) 7.46 – 7.54 (m, 2 H) 7.58 – 7.65 (m, 2 H)

1.6.1.X ADL12–D22 (R)



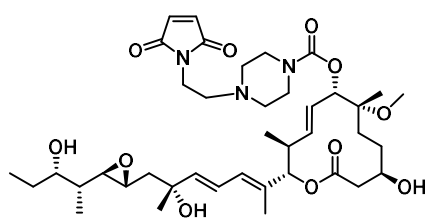
[1117] Enlazador–carga útil (ADL12–D28): El procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 se empleó para sintetizar ácido 3–((R)–1–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (3.2 mg, 3.60 µmol, 15.39 % de rendimiento). LC/MS $[M+]^+$ 888.5

1.6.1.X ADL12–D22 (S)



[1118] Enlazador–carga útil (ADL12–D28): El procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 se empleó para sintetizar ácido 3–((S)–1–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (3.6 mg, 3.60 µmol, 28.7 % de rendimiento). LC/MS $[M+]^+$ 888.56

1.6.1.2 ADL14–D1

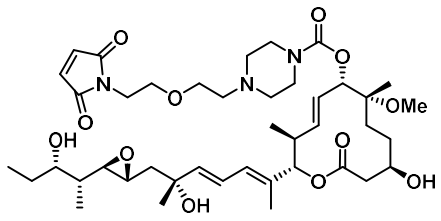


[1119] Enlazador–carga útil (ADL14–D1): Se empleó el procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 para sintetizar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)etil)piperazin–1–carboxilato (8 mg, 10.53 µmol, 33.5 % de

rendimiento). LC/MS [M+H] 760.3.

[1120] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.85 – 1.01 (m, 9 H), 1.17 – 1.33 (m, 5 H), 1.36 (s, 3 H), 1.41 – 1.71 (m, 7 H), 1.80 (s, 3 H), 1.83 – 1.95 (m, 1 H), 2.48 (br s, 10 H), 2.89 – 2.98 (m, 1 H), 3.40 – 3.57 (m, 5 H), 3.61 – 3.72 (m, 2 H), 3.78 – 3.91 (m, 1 H), 4.98 – 5.14 (m, 2 H), 5.50 – 5.52 (m, 1 H), 5.52 – 5.65 (m, 1 H), 5.69 – 5.82 (m, 1 H), 5.86 – 5.96 (m, 1 H), 6.09 – 6.21 (m, 1 H), 6.47 – 6.60 (m, 1 H), 6.79 – 6.90 (m, 2 H).

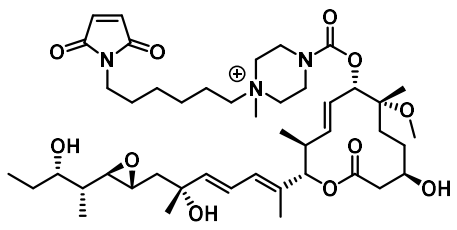
1.6.1.3 ADL15–D1



[1121] Enlazador–carga útil (ADL15–D1): Se empleó el procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 para sintetizar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–(2–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)etoxi)etil)piperazin–1–carboxilato (7 mg, 8.71 µmol, 23.10 % de rendimiento). LC/MS [M=+H] 804.1.

[1122] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.85 – 1.02 (m, 9 H), 1.18 – 1.32 (m, 4 H), 1.36 (s, 3 H), 1.40 – 1.72 (m, 7 H), 1.78 – 1.83 (m, 3 H), 1.85 – 1.93 (m, 1 H), 2.42 – 2.65 (m, 9 H), 2.67 – 2.73 (m, 1 H), 2.89 – 2.96 (m, 1 H), 3.37 (s, 5 H), 3.41 – 3.58 (m, 5 H), 3.59 – 3.67 (m, 4 H), 3.68 – 3.75 (m, 2 H), 3.81 – 3.89 (m, 1 H), 4.94 – 5.15 (m, 2 H), 5.61 (br d, J=10.04 Hz, 1 H), 5.69 – 5.82 (m, 1 H), 5.89 (br d, J=15.18 Hz, 1 H), 6.16 (br d, J=10.92 Hz, 1 H), 6.56 (br s, 1 H), 6.77 – 6.91 (m, 2 H).

1.7 ADL12–D2

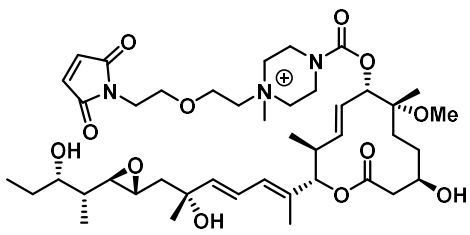


[1123] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)piperazin–1–carboxilato (26 mg, 0.032 mmol), acetonitrilo (319 µL, .032 mmol) y iodometano (19.92 µL, .319 mmol) se combinaron y se agitaron hasta el día siguiente. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y se cromatografió (0–30% MeOH en DCM) para proporcionar 1–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–

hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–metilpiperazin–1–io (14 mg, 0.017 mmol, 52.9 % de rendimiento). LC/MS [M+] 831.6.

[1124] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–d4): δ ppm 0.86 – 0.98 (m, 9 H) 1.26 (s, 4 H) 1.36 (s, 3 H) 1.40 – 1.58 (m, 9 H) 1.60 – 1.71 (m, 4 H) 1.80 (d, J=0.88 Hz, 4 H) 1.85 – 1.91 (m, 1 H) 1.87 – 1.88 (m, 1 H) 2.48 – 2.63 (m, 3 H) 2.65 – 2.72 (m, 1 H) 2.88 – 2.94 (m, 1 H) 3.18 (s, 3 H) 3.34 – 3.41 (m, 3 H) 3.53 (s, 10 H) 3.73 – 3.90 (m, 3 H) 3.90 – 4.06 (m, 2 H) 5.02 – 5.11 (m, 2 H) 5.56 – 5.66 (m, 1 H) 5.70 – 5.81 (m, 1 H) 5.84 – 5.94 (m, 1 H) 6.11 – 6.20 (m, 1 H) 6.50 – 6.60 (m, 1 H) 6.83 (s, 2 H).

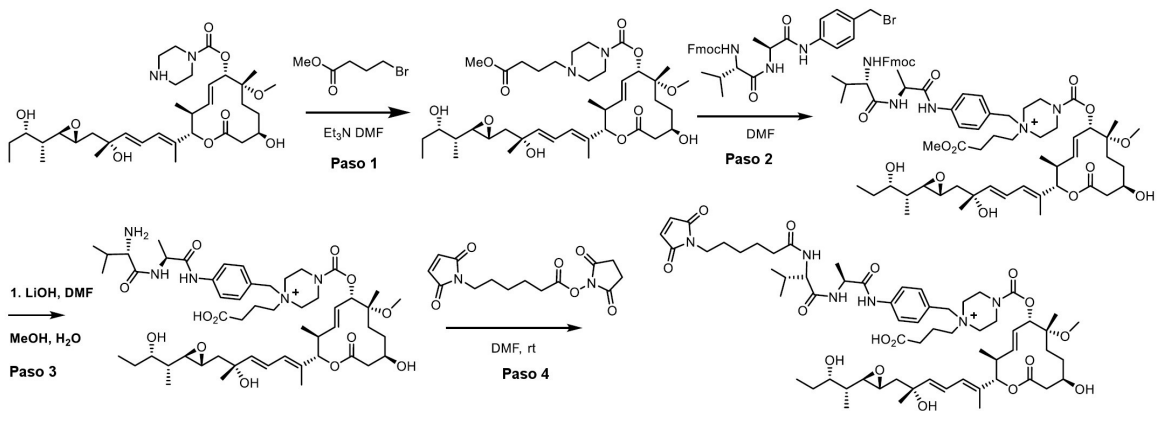
1.8 ADL15–D2



[1125] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2S,3S)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–(2–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)etoxi)etil)piperazin–1–carboxilato (6 mg, 7.463 µmol), iodometano (0.467 µL, 7.463 µmol) y acetonitrilo (0.390 µL, 7.463 µmol) se combinaron y se agitaron a RT. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad para proporcionar (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(2–(2–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)etoxi)etil)–4–metil–4l4–piperazin–1–carboxilato (6 mg, 7.33 µmol, 98 % de rendimiento). LC/MS [M+]$^+$ 819.28.

[1126] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.74 – 0.88 (m, 9 H) 1.18 (br d, *J*=4.27 Hz, 5 H) 1.23 – 1.27 (m, 3 H) 1.28 – 1.49 (m, 5 H) 1.51 – 1.61 (m, 2 H) 1.66 – 1.71 (m, 3 H) 1.73 – 1.80 (m, 1 H) 2.36 – 2.53 (m, 3 H) 2.55 – 2.60 (m, 1 H) 2.78 – 2.83 (m, 1 H) 3.10 – 3.14 (m, 3 H) 3.23 – 3.25 (m, 3 H) 3.32 – 3.51 (m, 5 H) 3.52 – 3.67 (m, 6 H) 3.67 – 3.87 (m, 7 H) 4.93 – 5.01 (m, 2 H) 5.44 – 5.55 (m, 1 H) 5.61 – 5.70 (m, 1 H) 6.00 – 6.07 (m, 1 H) 6.38 – 6.48 (m, 1 H) 6.75 (s, 2 H).

1.9 ADL5–D25



Esquema 8

[1127] Paso 1: D1 (40 mg, 0.063 mmol) se disolvió en N,N–dimetilformamida (730 µl, 9.422 mmol) y se agregó metil–bromobutarato (23.69 µL, 0.188 mmol) seguido por trietilamina (35.0 µL, 0.251 mmol). La solución se agitó a RT durante 2 días. El solvente se evaporó. La purificación por cromatografía en columna proporcionó (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(4–metoxi–4–oxobutil)piperazin–1–carboxilato (51 mg, 0.069 mmol, ~100 % de rendimiento) en forma de aceite incoloro. LC/MS (ESI, m/z), 737.4 $[M+H]^+$.

[1128] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.76 – 0.86 (m, 9 H), 1.12 (s, 3 H), 1.14–1.19 (m, 1 H), 1.24 (s, 3 H), 1.34–1.50 (m, 5 H), 1.52–1.60 (m, 1 H), 1.69 (s, 6 H), 2.27 (s, 8 H), 2.37–2.49 (m, 3 H), 2.54–2.61 (m, 1 H), 2.77–2.83 (m, 1 H), 3.35–3.47 (m, 5 H), 3.56 (s, 3 H), 3.67–3.76 (m, 1 H), 4.46 (s, 3 H), 4.89–5.00 (m, 3 H), 5.42–5.52 (m, 1 H), 5.57–5.70 (m, 1 H), 5.73–5.81 (m, 1 H), 5.98–6.08 (m, 1 H), 6.43 (dd, *J*=15.25, 10.98 Hz, 1 H).

[1129] Paso 2: Se suspendió Fmoc–ValAla–PAB bromuro (88 mg, 0.152 mmol) y (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il 4–(4–metoxi–4–oxobutil)piperazin–1–carboxilato (51 mg, 0.069 mmol) en N,N–dimetilformamida (670 µL, 8.651 mmol). La reacción se agitó a RT hasta el día siguiente. El solvente se evaporó. La purificación por cromatografía en columna proporcionó 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–(4–metoxi–4–oxobutil)piperazin–1–io (42 mg, 0.034 mmol, 49.1 % de rendimiento) en forma de sólido ceroso. LC/MS (ESI, m/z), 1235.4 $[M]^+$.

[1130] Paso 3: 1–(4–((S)–2–((S)–2–((((9H–fluoren–9–il)metoxi)carbonil)amino)–3–

metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)–1–(4–metoxi–4–oxobutil)piperazin–1–io (42 mg, 0.034 mmol) se disolvió en una proporción 5:2:1 de THF (600 µL, 7.322 mmol), MeOH (250 µL, 6.179 mmol) y agua (125 µL, 6.939 mmol), y se agregó hidróxido de litio (1.221 mg, 0.051 mmol). La mezcla se agitó a RT durante 1 hora. La mezcla se extinguió con ácido acético (5.84 µL, 0.102 mmol) y el solvente se evaporó y se purificó por RP HPLC para proporcionar 1–(4–((S)–2–((S)–2–amino–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–1–(3–carboxipropil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–1–io en forma de sólido ceroso (18.4 mg, 0.018 mmol, 54.2 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 998.5 $[M]^+$.

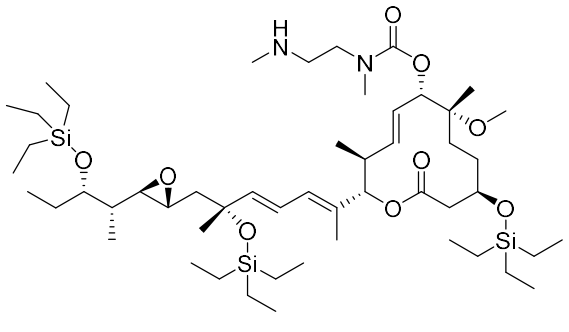
[1131] Paso 4: 1–(4–((S)–2–((S)–2–amino–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–1–(3–carboxipropil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–1–io (18.4 mg, 0.018 mmol) se disolvió en N,N–dimetilformamida (356 µL, 4.603 mmol) y se agregó 2,5–dioxopirrolidin–1–il 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanoato (6.81 mg, 0.022 mmol) seguido por base de Hunig (8.04 µL, 0.046 mmol). La solución de reacción se agitó a RT durante 30 minutos. El solvente se evaporó y el residuo en bruto se purificó por RP HPLC para proporcionar (1–(3–carboxipropil)–1–(4–((S)–2–((R)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)propanamido)bencil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–1–io (8.8 mg, 7.38 µmol, 40.1 % de rendimiento) en forma de sólido liofilizado blanco. LC/MS (ESI, m/z), 1191.5 $[M]^+$.

[1132] ^{1}H–RMN (400 MHz, DMSO–*d*6): δ ppm 0.68–0.81 (m, 18 H), 0.98–1.07 (m, 4 H), 1.07–1.14 (m, 3 H), 1.16 (br d, *J*=3.89 Hz, 5 H), 1.22–1.33 (m, 8 H), 1.36–1.47 (m, 7 H), 1.62 (s, 3 H) 1.66–1.73 (m, 1 H), 1.83–1.92 (m, 5 H), 1.98–2.13 (m, 2 H), 2.26 (dt, *J*=3.54, 1.80 Hz, 1 H), 2.27–2.33 (m, 1 H), 2.47–2.51 (m, 2 H), 2.58–2.62 (m, 1 H), 2.66–2.72 (m, 1 H), 3.15 (s, 3 H) 3.45–3.58 (m, 3 H), 3.60–3.68 (m, 2 H) 3.77–3.86 (m, 2 H), 4.06–4.13 (m, 1 H), 4.27–4.37 (m, 2 H), 4.46–4.54 (m, 3 H), 4.72–4.78 (m, 1 H), 4.80–4.87 (m, 2 H), 5.32–5.48 (m, 1 H), 5.53–5.67 (m, 1 H), 5.73–5.86 (m, 1 H), 5.93–6.05 (m, 1 H), 6.16–6.26 (m, 1 H), 6.20 (s, 1 H), 6.23–6.41 (m, 1 H), 6.27–6.38 (m, 1 H), 6.93 (s, 2 H), 6.98–7.06 (m, 2 H),

7.43–7.50 (m, 2 H), 7.62–7.69 (m, 2 H), 7.74–7.80 (m, 1 H), 8.22–8.27 (m, 1 H), 8.44–8.49 (m, 4 H), 10.15–10.22 (m, 1 H).

1.10 ADL12–D20 y ADL12–D21

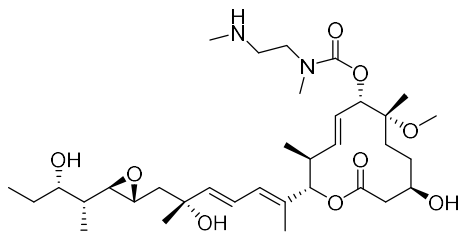
[1133] Se empleó el Procedimiento General 1 descrito en la sección 1.2.1 para sintetizar D20.



[1134] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–metoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il metil(2–(metilamino)etil)carbamato (43 mg, 0.044 mmol, 90 % de rendimiento) en forma de aceite incoloro. LC/MS (ESI, m/z), 981.4 $[M+H]^+$.

[1135] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.62–0.73 (m, 18 H), 0.82–0.93 (m, 9 H), 0.95–1.06 (m, 27 H), 1.24 (br s, 4 H), 1.45 (br s, 10 H), 1.78 (br s, 3 H), 1.92–2.00 (m, 1 H), 2.46 (br s, 4 H), 2.51–2.67 (m, 3 H), 2.76–2.84 (m, 2 H), 2.86–2.93 (m, 1 H), 2.93–3.02 (m, 3 H), 3.34–3.38 (m, 3 H), 3.43–3.49 (m, 2 H), 3.72–3.82 (m, 1 H), 3.93–4.04 (m, 1 H), 4.94–5.07 (m, 2 H), 5.53–5.64 (m, 1 H), 5.72–5.89 (m, 2 H), 6.07–6.21 (m, 1 H), 6.44–6.61 (m, 1 H).

D20

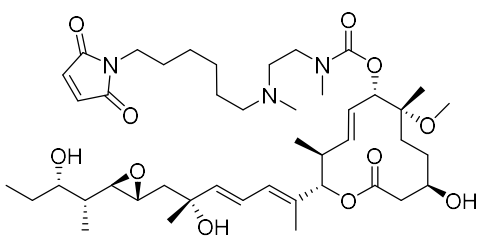


[1136] (2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il metil(2–(metilamino)etil)carbamato (16.4 mg, 0.026 mmol, 58.6 % de rendimiento) en forma de aceite incoloro. LC/MS (ESI, m/z), 639.7 $[M+H]^+$.

[1137] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.92 (br d, *J*=6.53 Hz, 9 H), 1.25 (br s, 4 H), 1.36 (s, 3 H), 1.41–1.74 (m, 6 H), 1.45–1.59 (m, 1 H), 1.64–1.72 (m, 1 H), 1.80 (s, 3 H), 1.85–1.94 (m, 1 H), 2.42 (s, 3 H), 2.50–2.63 (m, 3 H), 2.65–2.73 (m, 1 H), 2.73–2.80 (m, 2 H), 2.88–3.01 (m, 4 H), 3.35–3.38 (m, 3 H), 3.35–3.40 (m, 3 H), 3.41–3.48 (m, 2 H), 3.52–

3.57 (m, 1 H), 3.78–3.89 (m, 1 H), 5.00–5.13 (m, 2 H), 5.53–5.64 (m, 1 H), 5.71–5.82 (m, 1 H), 5.84–5.94 (m, 1 H), 6.12–6.19 (m, 1 H), 6.49–6.61 (m, 1 H).

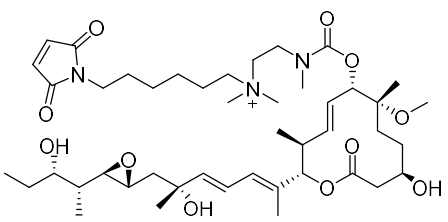
ADL12–D20



[1138] Se empleó el procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 para sintetizar ALD12–D20 y proporcionó (13.0 mg, 0.016 mmol, 67.7%) en forma de aceite incoloro. LC/MS (ESI, m/z), 818.3 $[M+H]^+$.

[1139] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.91 (br s, 9 H), 1.21–1.31 (m, 4 H), 1.36 (br s, 7 H), 1.46–1.73 (m, 11 H), 1.80 (s, 3 H), 1.84–1.93 (m, 1 H), 2.50–2.72 (m, 7 H), 2.75–2.85 (m, 1 H), 2.87–3.09 (m, 7 H), 3.48–3.68 (m, 6 H) 3.80–3.89 (m, 1 H), 5.02–5.13 (m, 2 H), 5.55–5.66 (m, 1 H), 5.71–5.82 (m, 1 H), 5.85–5.94 (m, 1 H), 6.11–6.22 (m, 1 H), 6.49–6.61 (m, 1 H), 6.83 (br d, *J*=1.13 Hz, 2 H).

ADL12–D21



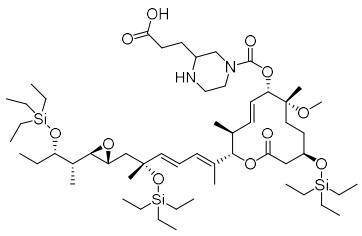
[1140] ((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il (2–((6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexil)(metil)amino)etil)(metil)carbamato (7 mg, 8.557 µmol) se disolvió en N,N–dimetilformamida (99 µl, 1.284 mmol) y se agregó ioduro de metilo (2.68 µL, 0.043 mmol). La solución se agitó a RT hasta el día siguiente. El solvente se evaporó. La purificación por cromatografía en columna proporcionó 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)–N–(2–(((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)–N,N–dimetilhexan–1–aminio (7 mg, 8.40 µmol, 98 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 832.7 $[M+H]^+$.

[1141] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.75 – 0.87 (m, 9 H), 1.14 (s, 4 H), 1.25 (s, 3 H), 1.27–1.45 (m, 9 H), 1.48–1.61 (m, 4 H), 1.69 (s, 4 H), 1.72–1.79 (m, 2 H), 2.35–2.53 (m, 3 H), 2.53–2.60 (m, 1 H), 2.75–2.83 (m, 1 H), 2.85–2.95 (m, 3 H), 3.06 (br d, *J*=10.42 Hz, 6 H), 3.15–3.20 (m, 2 H), 3.25 (br d, *J*=2.38 Hz, 3 H), 3.42 (br d, *J*=6.90 Hz, 5 H), 3.53–3.69 (m, 2 H), 3.69–3.78 (m, 1 H), 4.88–5.01 (m, 2 H), 5.44–5.56 (m, 1 H), 5.59–5.72

(m, 1 H), 5.73–5.83 (m, 1 H), 5.99–6.10 (m, 1 H), 6.40 (s, 1 H), 6.72 (s, 2 H).

1.11 ADL12–D22

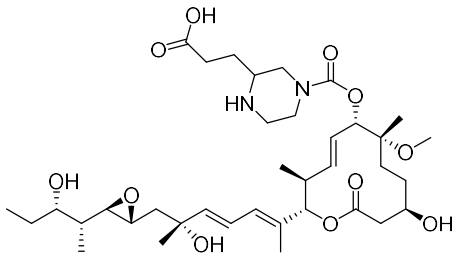
[1142] Se empleó el Procedimiento General 1 descrito en la sección 1.2.1 para sintetizar D22.



[1143] Ácido 3–(4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–7–metoxi–3,7–dimetil–2–((R,2E,4E)–6–metil–6–((trietilsilil)oxi)–7–((2R,3R)–3–((2S,3S)–3–((trietilsilil)oxi)pentan–2–il)oxiran–2–il)hepta–2,4–dien–2–il)–12–oxo–10–((trietilsilil)oxi)oxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (48 mg, 0.046 mmol, 34.4 % de rendimiento) en forma de aceite incoloro. LC/MS (ESI, m/z), 1051.4 $[M+H]^+$.

[1144] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.62–0.70 (m, 18 H), 0.82–0.94 (m, 9 H), 1.01 (tt, *J*=7.92, 3.18 Hz, 27 H), 1.22–1.28 (m, 4 H), 1.45 (s, 3 H), 1.47–1.66 (m, 7 H), 1.76–1.87 (m, 5 H), 1.92–1.99 (m, 1 H), 2.36–2.47 (m, 3 H), 2.50–2.68 (m, 3 H), 2.86–2.93 (m, 1 H), 2.98–3.08 (m, 2 H), 3.10–3.18 (m, 1 H), 3.18–3.26 (m, 2 H), 3.27–3.31 (m, 1 H), 3.34–3.36 (m, 3 H), 3.36–3.37 (m, 1 H) 3.72–3.81 (m, 1 H), 3.95–4.19 (m, 3 H), 4.93–5.00 (m, 1 H), 5.01–5.07 (m, 1 H), 5.54–5.66 (m, 1 H) 5.72–5.81 (m, 1 H) 5.81–5.90 (m, 1 H), 6.12–6.19 (m, 1 H), 6.47–6.58 (m, 1 H).

D22

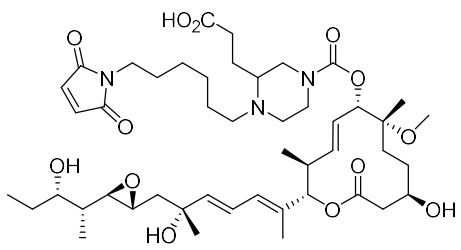


[1145] Ácido N–etil–N–isopropilpropan– 3–(4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (23.5 mg, 0.031 mmol, 68.2 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 709.5 $[M+H]^+$.

[1146] ^{1}H–RMN (400 MHz, DMSO–*d*6): δ ppm 0.71–0.77 (m, 9 H), 1.03 (s, 5 H), 1.14–1.20 (m, 6 H), 1.23–1.33 (m, 5 H), 1.36–1.48 (m, 5 H), 1.63 (s, 3 H), 1.67–1.75 (m, 1 H), 2.13–2.24 (m, 4 H), 2.58–2.64 (m, 1 H), 2.68–2.81 (m, 2 H), 3.20–3.20 (m, 3 H), 3.61–3.77 (m, 4 H), 4.28–4.39 (m, 1 H), 4.44–4.53 (m, 1 H), 4.79–4.88 (m, 2 H), 5.28–5.43 (m, 1 H), 5.52–5.66 (m, 1 H), 5.73–5.85 (m, 1 H), 5.94–6.04 (m, 1 H), 6.27–6.41 (m, 1 H), 6.43–

6.53 (m, 2 H), 8.19–8.29 (m, 1 H).

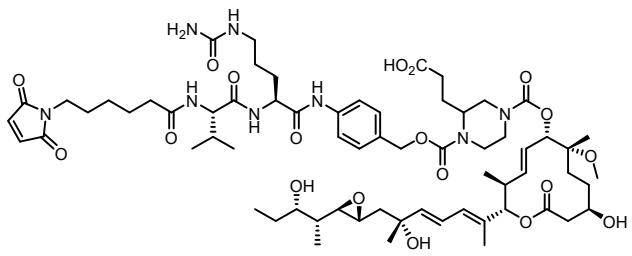
ADL12–D22



[1147] Se empleó el procedimiento general descrito en la sección 1.6.1 para sintetizar ADL–12–D22 (3.6 mg, 4.05 µmol, 34.4 % de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 888.7 $[M+H]^+$.

[1148] ^{1}H–RMN (400 MHz, MeOH–*d*4): δ ppm 0.77–0.89 (m, 9 H), 1.08–1.31 (m, 13 H), 1.35–1.60 (m, 12 H), 1.69 (s, 3 H), 1.73–1.83 (m, 1 H), 1.85–1.97 (m, 1 H), 2.15–2.27 (m, 1 H), 2.27–2.83 (m, 11 H), 2.84–2.98 (m, 1 H), 3.39 (s, 7 H), 3.67–3.77 (m, 1 H), 4.89–5.01 (m, 2 H), 5.40–5.53 (m, 1 H), 5.59–5.69 (m, 1 H), 5.72–5.83 (m, 1 H), 5.99–6.11 (m, 1 H), 6.37–6.49 (m, 1 H), 6.69 (s, 2 H).

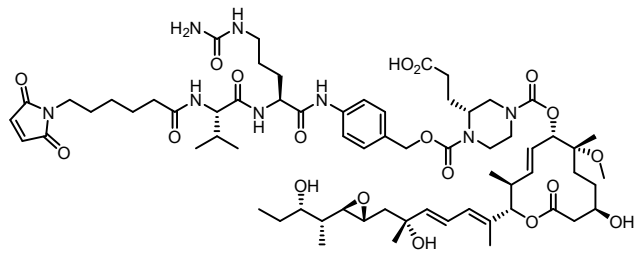
ADL1–D22



[1149] Se empleó el Procedimiento General 1 descrito en la sección 1.2.1 para sintetizar ADL1–D22 (4.7 mg, 3.59 µmol, 38.6 % de rendimiento) en forma de sólido liofilizado blanco. LC/MS (ESI, m/z), 1307.6 $[M+H]^+$.

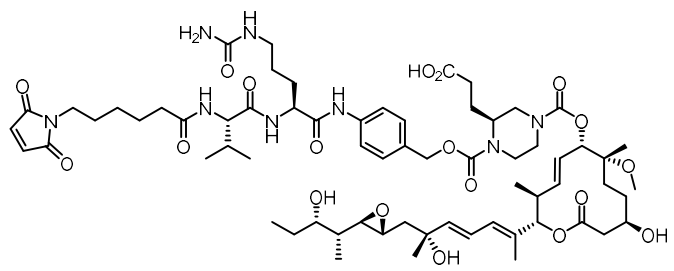
[1150] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO–*d*6): δ ppm 0.68–0.79 (m, 16 H), 1.03 (s, 3 H), 1.16 (s, 5 H), 1.23–1.44 (m, 13 H), 1.48–1.55 (m, 1 H), 1.62 (s, 4 H), 1.68–1.74 (m, 1 H), 1.86–1.93 (m, 1 H), 2.02 (s, 4 H), 2.24–2.37 (m, 3 H), 2.46–2.51 (m, 2 H), 2.66–2.73 (m, 1 H), 2.79–2.99 (m, 4 H), 3.15 (s, 3 H), 3.21–3.22 (m, 2 H), 3.30 (s, 4 H), 3.61–3.67 (m, 1 H), 3.73–3.88 (m, 3 H), 4.01–4.08 (m, 1 H), 4.09–4.16 (m, 1 H), 4.29–4.38 (m, 2 H), 4.43–4.51 (m, 1 H), 4.73–4.78 (m, 1 H), 4.79–4.88 (m, 2 H), 4.91–4.98 (m, 2 H), 5.29–5.43 (m, 3 H), 5.54–5.67 (m, 1 H), 5.74–5.83 (m, 1 H), 5.95–6.07 (m, 1 H), 6.28–6.40 (m, 1 H), 6.54–6.62 (m, 1 H), 6.93 (s, 2 H), 7.17–7.26 (m, 2 H), 7.44–7.57 (m, 2 H), 7.66–7.76 (m, 1 H), 7.95–8.03 (m, 1 H), 8.42–8.49 (m, 1 H), 9.89–9.96 (m, 1 H).

ADL1–D23



[1151] 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (16.76 mg, .023 mmol) y ácido 3–((R)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (16.1 mg, 0.023 mmol) se disolvieron en DMF (229 µl, 2.953 mmol) y se agregó base de Hunig (11.90 µl, 0.068 mmol). La mezcla de reacción se agitó hasta el día siguiente a rt. El solvente luego se evaporó y se sometió a purificación por HPLC en fase inversa para proporcionar ácido 3–((R)–1–(((4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (3.9 mg, 2.98 µmol, 13.13% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1308.6 $[M+H]^+$.

ADL1–D24 (S)



[1152] Se combinaron ácido 3–((S)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (10 mg, .014 mmol), N,N–dimetilformamida (141 µl, 0.014 mmol), base de Hunig (5 µl, 0.028 mmol), 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil (4–nitrofenil) carbonato (20.8 mg, .028 mmol) y se agitaron durante 2 horas y se cromatografiaron (MeOH / CH2Cl2) para proporcionar ácido 3–((S)–1–(((4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)–4–((((2S,3S,6S,7R,10R,E)–10–hidroxi–2–((R,2E,4E)–6–hidroxi–7–((2R,3R)–3–((2R,3S)–3–hidroxipentan–2–il)oxiran–2–il)–6–

metilhepta–2,4–dien–2–il)–7–metoxi–3,7–dimetil–12–oxooxaciclododec–4–en–6–il)oxi)carbonil)piperazin–2–il)propanoico (5 mg, 3.82 µmol, 27.1% de rendimiento). LC/MS (ESI, m/z), 1308.4 [M+H]+.

EJEMPLO 2

[1153] Se perfilaron las cargas útiles de modulador de espliceosoma ejemplares utilizadas en la preparación de ADC. Las cargas útiles se evaluaron para determinar la unión al complejo SF3b, la actividad de empalme *in vitro* y la capacidad para inhibir el crecimiento celular.

2.1 Unión de SF3B1 / Ensayo de proximidad de centelleo (SPA)

[1154] Se realizó un ensayo de proximidad de centelleo para medir la afinidad de unión de los compuestos ("cargas útiles") al complejo SF3b. La inmovilización por lotes del anticuerpo anti–SF3B1 (MBL) a las perlas de centelleo de PVT SPA anti–ratón (PerkinElmer) se preparó de la siguiente manera: por cada 2.5 mg de extractos nucleares, se mezclaron 5 µg de anticuerpo anti–SF3B1 y 1.5 mg de perlas en 150 µL de PBS. La mezcla de anticuerpo–perlas se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 18.000*g* durante 5 minutos. Se usaron 150 µl de PBS para resuspender cada 1.5 mg de mezcla de anticuerpo y perlas. Las perlas se suspendieron y se añadieron a los extractos nucleares preparados. La suspensión se incubó durante 2 horas a 4 ºC con mezcla suave. Las perlas se recogieron luego por centrifugación a 18.000*g* durante 5 minutos, y se lavaron dos veces con PBS + 0.1% Triton X–100. Después de una etapa de centrifugación final, cada 1.5 mg de perlas se suspendió con 150 µL de PBS. Los complejos de SF3b se evaluaron en cuanto a la unión a la sonda de pladienolida B marcada con [^{3}H] ([^{3}H]–PB), sintetizada como se describió anteriormente (Kotake *et al.* (2007) Nat Chem Biol. 3(9):570–5). Se prepararon reacciones de unión de 100 µl con 50 µl de suspensión de perlas y mediante la adición de concentraciones variables de PB o PB–OH, y después de 30 minutos de preincubación, se añadió 2.5 nM de [^{3}H]–PB. La mezcla se incubó durante 30 minutos, y las señales de luminiscencia se leyeron utilizando un contador de placas MicroBeta2 (PerkinElmer). Se utilizó Prism 7 (Graphpad) para el ajuste de la curva de regresión no lineal de los datos.

[1155] Se observaron perfiles de unión similares para todas las cargas útiles evaluadas (**FIG. 1**). En general, la unión específica estuvo en el rango nanomolar bajo, lo que sugiere que todas las cargas útiles evaluadas son potentes aglutinantes del complejo SF3b y compuestos candidatos prometedores para su uso en ADC.

2.2 Empalme *in vitro* (IVS)

[1156] Para evaluar la actividad de la carga útil en un sistema libre de células, se realizó un ensayo de empalme *in vitro*. Las cargas útiles se incubaron con extractos

nucleares y minigenes de sustrato pre–ARNm.

[1157] Preparación de extracto nuclear de HeLa: Los sedimentos celulares de HeLa S3 se resuspendieron en tampón hipotónico (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl, 0.2 mM de PMSF, 0.5 mM de DTT), y la suspensión se llevó hasta un total de 5 volúmenes de células empaquetadas (PCV). Después de la centrifugación, el sobrenadante se descartó, y las células se llevaron a 3 PCV con tampón hipotónico y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Las células se lisaron usando un homogeneizador Dounce y luego se centrifugaron. El sobrenadante se descartó, y el sedimento se resuspendió con ½ volumen nuclear empaquetado (PNV) de tampón bajo en sal (20 mM de HEPES pH 7.9, 1.5 mM de $MgCl_2$, 20 mM de KCl, 0.2 mM de EDTA, 25% glicerol, 0.2 mM de PMSF, 0.5 mM de DTT), seguido de ½ PNV de tampón con alto contenido de sal (igual que el tampón con bajo contenido de sal, excepto 1.4 mM de KCl). Los núcleos se mezclaron suavemente durante 30 minutos antes de centrifugar. El sobrenadante (extracto nuclear) se dializó luego en tampón de almacenamiento (20 mM de HEPES, pH 7.9, 100 mM de KCl, 0.2 mM de EDTA, 20% glicerol, 0.2 mM de PMSF, 0.5 mM de DTT). La concentración de proteínas se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 8000 UV–Vis (ThermoFisher Scientific).

[1158] IVS: Todas las secuencias derivadas de Ad2 (Pellizzoni *et al.* (1998) Cell 95(5):615–24) se clonaron en el vector pcDNA3.1(+) (Promega) utilizando sitios de restricción 5' EcoRI y 3' XbaI. Los plásmidos se linealizaron utilizando XbaI y se usaron como moldes de ADN en reacciones de transcripción *in vitro*. El plásmido sin intrón FtzΔi (Luo y Reed (1999) 96(26):14937–42) se linealizó usando EcoRI. Todos los ARN fueron transcritos *in vitro* y después se purificaron usando los kits MEGAscript T7 (Invitrogen) y MegaClear (Invitrogen), respectivamente. Para las reacciones de empalme que usan pre–ARNm de variante Ad2, se prepararon reacciones de 1 µL usando 8 µg de extractos nucleares preparados a partir de HeLa S3, 2 ng de pre–ARNm, 0.2 ng de FTZΔi y concentraciones variables de compuestos o DMSO. Después de 15 minutos de preincubación a 30 °C, se agregó 1 µl de tampón de activación de empalme (0.5 mM de ATP, 20 mM de fosfato de creatina, 1.6 mM de $MgCl_2$), y las reacciones se incubaron durante 90 minutos a 30 ºC. Las reacciones se extinguieron luego con 13 µl de DMSO, y se usaron 25 nl para RT–qPCR. Las reacciones de RT–qPCR se prepararon utilizando el kit TaqMan RNA–to–C_T de 1 paso (Life Technologies), ARN de reacciones de empalme, conjuntos de cebador–sonda de ARNm Ad2 (directo: ACTCTCTTCCGCATCGCTGT; inverso: CCGACGGGTTTCCGATCCAA; sonda: CTGTTGGGCTCGCGGTTG) y Ftz (directo: TGGCATCAGATTGCAAAGAC; inverso: ACGCCGGGTGATGTATCTAT; sonda: CGAAACGCACCCGTCAGACG). Se usó Prism 7 (Graphpad) para el ajuste de la curva de

regresión no lineal del producto empalmado formado y se normalizó a la muestra de control (DMSO).

[1159] Dado que todas las cargas útiles evaluadas se unen específicamente al complejo SF3b y muestran perfiles de enlace similares (**FIG. 1**), se planteó la hipótesis de que todas las cargas útiles también deberían modular el empalme en un grado comparable. Todas las cargas útiles modularon significativamente el empalme del pre–ARNm Ad2.2 (**FIG. 2**). En presencia de carga útil, se observó una disminución en la cantidad de producto empalmado.

2.3 Viabilidad celular

[1160] Las células de carcinoma ductal mamario HCC1954 (*American Type Culture Collection* (ATCC)) se sembraron a razón de 2000 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano (Corning) en un volumen total de 90 µL de medio de cultivo de tejidos complementado con 10% de suero fetal bovino (ThermoFisher Scientific). Las células se trataron con una dilución en serie de 3 veces del compuesto de 200 nM a 0.03 nM. Cada concentración se ensayó por triplicado. En el momento del tratamiento, se evaluó una placa de células no tratadas utilizando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter–Glo® 2.0 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Promega; # G9241). El reactivo CellTiter–Glo® 2.0 se añadió al medio, se incubó y se analizó en un lector EnVision Multilabel (PerkinElmer). Los valores representan el tiempo cero (T0). El número de células viables después de 144 horas (T144) de tratamiento con el compuesto también se determinó utilizando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter–Glo® 2.0. Usando el valor de luminiscencia en el tiempo cero (T0), se calculó el porcentaje de crecimiento del control de DMSO (C) y de crecimiento de ensayo en presencia del compuesto (T144) en cada uno de los niveles de concentración del compuesto. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó como: [(T144–T0) / (C–T0)] x 100 para concentraciones para las cuales T144 >/= T0 o [(T144–T0) / T0] x 100 para concentraciones para las cuales T144 <T0. Los gráficos de la curva de respuesta a la dosis se generaron utilizando Prism 7 (Graphpad) y se ajustaron utilizando el análisis de regresión no lineal y la pendiente variable de log(inhibidor) versus respuesta (cuatro parámetros).

[1161] La respuesta de la dosis de viabilidad celular se determinó para todas las cargas útiles en células de cáncer de mama HCC1954 amplificadas con HER2. La mayoría de las cargas útiles evaluadas mostraron valores de GI_{50} (es decir, la concentración del compuesto para causar una reducción del 50% en la proliferación celular) en el rango nanomolar de un solo dígito, con la excepción de cargas útiles poco permeables, como D25 (**FIG. 3**). Los datos de permeabilidad ejemplares se muestran en la Tabla 14.

EJEMPLO 3

[1162] Las cargas útiles ejemplares evaluadas en el Ejemplo 2 se conjugaron con un anticuerpo anti–HER2 ejemplar (trastuzumab) a través de residuos de cisteína en el anticuerpo. La preparación y evaluación de los ADC anti–HER2 ejemplares se describe a continuación.

3.1 Anticuerpo

[1163] El anticuerpo trastuzumab ("AB185") (Molina *et al.* (2001) Cancer Res. 61(12):4744–9) se usó para la preparación de ADC anti–HER2 (también referidos aquí como SMLA).

3.2 Bioconjugación

[1164] El anticuerpo (trastuzumab) a 10 mg/ml en tampón de PBS (pH 7.0) se mezcló con 5 mM de TCEP (2–4 equivalentes molares) (ThermoFisher Scientific; nº 77720) para romper los enlaces disulfuro intercatenarios. La reacción se mezcló suavemente a 22 °C durante 3 horas. Luego se añadió propilenglicol (15% v/v) seguido de 8 equivalentes molares de enlazador–carga útil (6 mM de solución madre en DMSO), y la solución se mezcló completamente. La reacción se colocó en una placa rotatoria en una incubadora a 22 °C. Después de una conjugación de 2 horas, la mezcla de reacción se purificó para eliminar la carga útil no conjugada con AKTA GE M150 (columna desalinizadora HiTrapTM 26/10; caudal: 3 ml/min) (GE Healthcare Bio–Sciences) en DPBS (pH 7.5). El conjugado resultante se concentró a través de ultrafiltración Amicon (30 kDa, Ultra–4) (EMD Millipore) y se sometió a filtración estéril a través de un filtro desechable de PVDF de 0.22 µm (EMD Millipore). La solución transparente final se midió mediante UV–VIS para determinar la concentración de anticuerpo ([mAb]; mol/L) y la concentración de la carga útil conjugada ([LD]; mol/L) de acuerdo con la ley de Beer–Lambert (A=*E*c*l*) y las siguientes ecuaciones:

$$A_{280nm} = {E^{mAb}}_{280nm} * [mAb] * l + {E^{LD}}_{280nm} * [LD] * l$$

$$A_{252nm} = {E^{mAb}}_{252nm} * [mAb] * l + {E^{LD}}_{252nm} * [LD] * l$$

E^{mAb}_{280nm}: trastuzumab = 213,380 $cm^{-1}M^{-1}$

E^{mAb}_{252nm}: trastuzumab = 79,112 $cm^{-1}M^{-1}$

E^{LD}_{280nm} = 800 $cm^{-1}M^{-1}$

E^{LD}_{252nm} = 31,000 $cm^{-1}M^{-1}$

Abreviaturas: c – concentración molar; l – longitud de la trayectoria de la luz (Nanodrop: 0.1 cm); *E* – coeficiente de extinción molar; A – absorbancia.

3.3 Caracterización biofísica

[1165] La relación de fármaco a anticuerpo (DAR), el porcentaje de agregación y el porcentaje de carga útil no conjugada se analizaron para los ADC anti–HER2 ejemplares

mediante cromatografía líquida–espectrometría de masas (LC/MS), cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (HPLC), respectivamente. En general, los conjugados contenían menos del 2% de fármaco libre y contenían menos del 10% de agregado.

3.3.1 Análisis de LC/MS – DAR

[1166] El análisis de LC/MS se realizó usando un sistema Agilent 1290 UPLC conectado a un espectrómetro de masas Agilent G6224A Accurate Mass TOF. El conjugado se desglicosiló con PNGasa F (New England Biolabs; # P0705L) durante 4 horas a 37 °C, se desnaturalizó con 8 M Gdn–HCl (Sigma; # G9284) y finalmente se separó en dominios de cadena liviana y pesada usando DTT (5 mM de concentración final) (Promega; # V3151). La muestra preparada se inyectó en una columna Agilent PLRP–S (2.1 x 150 mm, 8 µm) y se eluyó con un gradiente de 25% B a 50% B durante 28 minutos a temperatura ambiente (RT). La fase móvil A fue agua con 0.05% TFA, la fase móvil B fue acetonitrilo con 0.04% TFA, y el caudal fue de 1 ml/min. DAR se calculó a partir del espectro de masas desenrollado promediando en forma ponderada las intensidades de los picos de fármaco no conjugados y conjugados para la cadena liviana (L0 o L1) y la cadena pesada (H0, H1, H2 y H3). El DAR total del conjugado intacto se calculó utilizando la ecuación: $(DAR_{LC}*2) + (DAR_{HC}*2)$ = DAR total. Los valores de DAR para ADC anti–HER2 ejemplares se informan en las Tablas 10–14.

3.3.2 Análisis SEC – Agregación

[1167] La cromatografía de exclusión de tamaño se realizó utilizando una columna TOSON–G3000SWXL (# 008541) en 0.2 M fosfato de potasio (pH 7) con 0.25 mM cloruro de potasio y 15% (v/v) IPA a una velocidad de flujo de 0.75 ml/min. La absorbancia del área pico a 280 nm se determinó para los componentes de alto peso molecular y conjugado monomérico por integración del área bajo la curva. El porcentaje de monómero para los ADC anti–HER2 ejemplares se presenta en la Tabla 10.

3.3.3 Análisis de HPLC – Fármaco libre

[1168] El conjugado se precipitó con 10 volúmenes de acetonitrilo en hielo durante 2 horas y se centrifugó. Los sobrenadantes que contenían la carga útil residual no conjugada se inyectaron luego en una columna Agilent Poroshell 120 SB–C18 120A (4.6 x 100 mm, 2.7 µm) y se eluyeron con un gradiente de 45% B a 70% B durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase móvil A fue 100% agua, la fase móvil B fue 100% acetonitrilo, y la velocidad de flujo fue de 0.6 ml/min con detección a 252 nm. La cantidad de fármaco libre residual se cuantificó mediante detección UV en comparación con la curva estándar externa de enlazador–carga útil no conjugado. El porcentaje de fármaco libre para los ADC anti–HER2 ejemplares se informa en la Tabla 10.

3.4 Caracterización de unión

3.4.1 Unión FACS a células positivas para el blanco

[1169] La unión del anticuerpo anti–HER2 no conjugado y los ADC anti–HER2 a células positivas para el blanco se evaluó mediante citometría de flujo utilizando inmunofluorescencia indirecta. Las células JIMT1 (DSMZ), una línea celular de cáncer de mama que expresa de manera endógena HER2, se colocaron en placas (5 x 10^4 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos con fondo en V (Greiner Bio–One) y se incubaron durante 2 horas a 4 °C con los compuestos de ensayo diluidos a diversas concentraciones en medio de ensayo (RPMI–1640 complementado con 10% (p/v) de albúmina de suero fetal bovino (Thermo Fisher Scientific)). Luego, las células se lavaron con PBS + 2% FBS (tampón FACS) y se tiñeron con anticuerpo de inmunoglobulina G (IgG) antihumano de cabra marcado con ficoeritrina (PE) (Invitrogen) durante 40 minutos a 4 ºC en la oscuridad. Las células se lavaron con tampón FACS frío y se fijaron con tampón FluroFix (Biolegend) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El fijador se lavó con tampón FACS. Las células fijadas se analizaron para determinar la fluorescencia media geométrica de PE utilizando un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Bioscience). Trastuzumab y T–DM1 (DM1 conjugado con trastuzumab) se incluyeron como controles.

[1170] Todos los ADC anti–HER2 demostraron una unión robusta a HER2 en células JIMT1. La unión de ADC fue comparable a la unión de trastuzumab y T–DM1 (**FIG. 4**). Esto sugiere que la conjugación con la carga útil no afecta la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo.

3.5 Análisis *in vitro*

3.5.1 Viabilidad celular

[1171] Los ADC anti–HER2 se evaluaron en varias líneas celulares amplificadas con HER2 en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento celular. Se utilizaron las líneas celulares HCC1954 (ATCC), 2000 células/pocillo), N87 (ATCC, 4000 células/pocillo), SKBR3 (ATCC, 3000 células/pocillo) y MCF7 (ATCC, 1500 células/pocillo). El análisis de la viabilidad celular se realizó como se describe en la sección 2.3.

[1172] Sorprendentemente, no todos los ADC fueron activos en células HCC1954, a pesar de tener perfiles de unión similares (**FIG. 1**) y cargas útiles con propiedades bioquímicas similares. Los ADC con ciertos enlazadores (por ejemplo, ADL10) y/o ciertas cargas útiles (por ejemplo, D14) fueron menos capaces de inhibir el crecimiento celular, mientras que los ADC con enlazadores alternativos (ADL1, ADL5, ADL12) y/o cargas útiles alternativas (por ejemplo, D1, D25, D2, D4) fueron más potentes en células HCC1954 (**FIG. 5A** y Tablas 10, 11 y 14). Estas tendencias se observaron generalmente en todas las líneas celulares (HCC1954, N87 y SKBR3) e indicaciones (HCC1954 y SKBR3 son líneas de cáncer

de mama HER2 altas; N87 es una línea de cáncer gástrico HER2 alta) (**FIGS. 5B–C** y Tablas 11 y 12). Además, en general, los enlazadores no escindibles tradicionales, como ADL10, no entregaron cargas útiles de modulador de empalme eficientemente. Sin embargo, pequeñas modificaciones en la longitud de los mismos enlazadores hicieron que los ADC fueran mucho más potentes, por ejemplo, comparar la respuesta de dosis de viabilidad celular de AB185–ADL10–D1 con AB185–ADL12–D1 (**FIGS. 5A–C**).

[1173] Para garantizar que la actividad de los ADC anti–HER2 sea dependiente del antígeno, se trataron células MCF7 negativas para HER2. Ninguno de los ADC evaluados fue activo a las mismas concentraciones que las células positivas para HER2 dirigidas de manera robusta (**FIG. 6** y Tabla 13). Esto sugiere que la actividad de ADC anti–HER2 es dependiente del antígeno.

Tabla 10. Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enla-zador	Nombe enlazador	DAR	% monó-mero	Fárma-co libre (%)	Concentra-ción (mg/ml)	CTGlo Media g GI50 HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media Respuesta min% HCC1954.1
AB185-ADL10-110978-01	Plad D	ADL0010-01	maleimido caproí	2.000	99.000	<1	0.730	>200.000	>200.000	58.601
AB185-ADL10-79392-01	Plad D	ADL0010-01	maleimido caproí	3.600	97.000	<1	3.600	25.502	>200.000	23.963
AB185-ADL5-105280-01	Aril plad	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	3.960	98.000	<1	1.400	2.668	>160.000	14.873
AB185-ADL1-110728-01	Aril plad	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	4.400	95.000	<1	0.550	2.086	158.245	
AB185-ADL5-110419-01	Aril plad	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.400	98.000	<1	1.200	0.943	>200.000	
AB185-ADL1-111512-01	Aril plad	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	4.340	88.000	<1	4.200	0.925	>200.000	1.271
AB185-ADL5-110900-01	Aril plad	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.000	98.000	<1	0.780	0.912	>200.000	-45.388

Tabla 10 (continuación). Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enla-zador	Nombe enlazador	DAR	% monó-mero	Fárma-co libre (%)	Concentra-ción (mg/ml)	CTGlo Media g GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media Respuesta min% HCC1954.1
AB185-ADL5-124-01	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	3.700	96.000	<1	0.880	0.806	>93.000	-30.929
AB185-ADL1-116814-01	Aril plad	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	8.000	95.000	<1	0.570	0.466	>200.000	-25.859
AB185-ADL1-116902-01	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	3.000	99.000	<1	0.840	0.443	>200.000	-7.520
AB185-ADL12-349-01	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6- (no escindible)	3.600	98.600	<1	1.060	0.432	>200.000	18.569
AB185-ADL1-110980-01	Plad B	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	5.000	98.000	<1	1.200	0.289	18.948	-94.860
AB185-ADL5-115517-01	Plad B	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	6.600	97.000	<1	3.230	0.278	>200.000	-47.381
AB185-ADL5-112048-02	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.020	97.000	<1	0.650	0.254	>200.000	-2.273

Tabla 10 (continuación). Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enla-zador	Nombe enlazador	DAR	% monó-mero	Fárma-co libre (%)	Concentra-ción (mg/ml)	CTGlo Media g GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media Respuesta min% HCC1954.1
AB185-ADL6-110413-01	Plad D	ADL0006-01	mc-Val-Ala-PABC	5.200	98.000	<1	0.500	0.244	4.206	-94.511
AB185-ADL5-349-04	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.140	99	<1	4.5	0.206	>200.000	-12.239
AB185-ADL1-110978-01	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	7.200	97.000	<1	3.410	0.188	>200.000	-55.079
AB185-ADL5-349-07	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.300	99.000	<1	5.440	0.179	>200.000	-18.586
AB185-ADL15-349-01	Plad D	ADL0015-01	mal-CH2CH2-O-CH2CH2- (no escindible)	3.300	98.800	<1	1.600	0.170	>200.000	-23.513
AB185-ADL12-116696-01	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6- (no escindible)	3.200	98.600	<1	1.390	0.142	>200.000	-57.399
AB185-ADL12-36483-01	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6- (no escindible)	3.300	98.800	<1	1.620	0.126	>200.000	-34.649

Tabla 10 (continuación). Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enla-zador	Nombe enlazador	DAR	% monó-mero	Fárma-co libre (%)	Concentra-ción (mg/ml)	CTGlo Media g GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media Respuesta min% HCC1954.1
T-DM1	DM1	ADL0019-01	SMCC	3.300	98.000	<1	3.300	0.118	2.759	-47.952
AB185-ADL5-349-03	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	8.500	98	<1	5.1	0.086	2.918	-63.909
AB185-ADL6-79392-01	Plad D	ADL0006-01	mc-Val-Ala-PABC	8.000	97.000	<1	1.200	0.081	2.877	-85.692
AB185-ADL12-79392-01	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6- (no escindible)	3.000	98.000	<1	2.860	0.081	2.148	-68.999
AB185-ADL12-116902-01	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6- (no escindible)	4.300	97.000	<1	0.120	0.078	>80.000	28.071
AB185-ADL1-110979-03	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	8.000	98.000	<1	3.600	0.073	1.949	-67.199
AB185-ADL15-79392-01	Plad D	ADL0015-01	mal-CH2CH2-O-CH2CH2- (no escindible)	3.200	98.800	<1	0.950	0.062	>200.000	-57.829

Tabla 10 (continuación). Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enla-zador	Nombe enlazador	DAR	% monó-mero	Fárma-co libre (%)	Concentra-ción (mg/ml)	CTGlo Media g GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media Respuesta min% HCC1954.1
AB185-ADL14-79392-01	Plad D	ADL0014-01	mal-CH2CH2- (no escindible)	3.500	98.600	<1	0.740	0.055	>200.000	-56.889
AB185-ADL1-110979-01	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	2.800	98.000	<1	1.200	0.050	>200.000	-57.212
AB185-ADL1-79392-21	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	3.900	99	<1	5.2	0.046	0.374	-78.519
AB185-ADL1-79392-24	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	4.000	98.000	<1	3.500	0.042	0.447	-77.970
AB185-ADL5-116378-01	Plad D Zwitt	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	6.000	98.000	<1	0.170	0.038	>113.000	-46.265
AB185-ADL1-79392-25	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	7.700	98.000	<1	4.200	0.034	0.120	-87.001

Tabla 11. Ejemplos de ADC anti–HER2 – células HCC1954

	ADC				Carga		
Muestra	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
AB185-ADL1-115801-01	4.4	0.05	0.421	-78.879	15.481	60.444	-87.02
AB185-ADL12-79392-01	3.1	0.064	4.86	-78.393	1.853	5.485	-75.579
AB185-ADL1-110978-01	7.2	0.075	1.01	-72.765	2.638	11.175	-80.463
AB185-105395-01 (T-DM1)	3.3	0.083	>200	-64.227			
AB185-ADL1-79392-19	4.04	0.089	2.078	-74.165	1.853	5.485	-75.579
AB185-ADL1-110979-02	4.9	0.145	1.217	-75.638	1.699	6.374	-81.34
AB185-ADL5-0349-07	4.1	0.18	>200	-36.513	0.6	2.758	-78.732
AB185-ADL5-110900-01	4	0.503	>200	-20.387	0.358	2.037	-84.412
AB185-ADL1-115286-01	3.8	5.994	>200	-8.011	0.208	0.787	-90.055
AB185-ADL12-0349-01	3.6	6.129	>200	18.763	0.6	2.758	-78.732
AB185-ADL10-79392-01	3.5	6.642	>200	8.138	1.853	5.485	-75.579
AB185-ADL5-116378-01	6.3	0.038	>113.000	-51.503	167.54	>200	26.882
AB185	N/A	>200	>200	76.916			

Tabla 12. Ejemplos de ADC anti–HER2 – células N87

	SMLA				Carga		
Muestra	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
AB185-ADL1-110979-02	4.9	0.093	>200	-40.056	3.241	38.774	-81.775
AB185-ADL5-110900-01	4	0.106	>200	-50.886	0.41	>200	-68.045
AB185-ADL5-116378-01	6.3	0.11	133	-43.398	>200	>200	40.364
AB185-ADL12-79392-01	3.1	0.111	>200	-41.228	7.041	>200	-40.041
AB185-ADL1-115286-01	3.8	0.113	>200	-39.509	0.275	2.993	-92.127
AB185-ADL1-79392-19	4.04	0.163	>200	-41.075	7.041	>200	-40.041
AB185-105395-01 (T-DM1)	3.3	0.168	>200	-20.785			
AB185-ADL1-110978-01	7.2	0.172	>200	-31.708	8.844	>200	-34.052
AB185-ADL5-0349-07	4.1	0.206	>200	-51.328	0.749	>200	-72.706
AB185-ADL12-0349-01	3.6	0.243	>200	-9.79	0.749	>200	-72.706
AB185-ADL1-11512-01	4.3	0.296	>200	-26.143	2.925	>200	-52.662
AB185-ADL10-79392-01	3.5	1.531	>200	30.759	7.041	>200	-40.041
AB185	N/A	>200	>200	77.029			

Tabla 13. Ejemplos de ADC anti–HER2 – células MCF7

	SMLA				Carga		
Muestra	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
AB185-105395-01 (T-DM1)	3.3	38.503	>200	3.876			
AB185-ADL12-79392-01	3.1	57.818	>200	-30.172	16.998	135.42	-63.414
AB185-ADL5-116378-01	6.3	80.856	113	28.12	>200	>200	65.639
AB185-ADL1-110979-02	4.9	189.392	>200	43.848	11.416	96.46	-60.923
AB185-ADL5-0349-07	4.1	>200	>200	56.182	2.851	30.318	-66.915
AB185-ADL1-110978-01	7.2	>200	>200	61.169	29.614	181.521	-62.957
AB185-ADL1-115286-01	3.8	>200	>200	48.851	0.883	7.697	-68.226
AB185-ADL5-110900-01	4	>200	>200	49.619	0.961	130.398	-68.503
AB185-ADL12-0349-01	3.6	>200	>200	48.868	2.851	30.318	-66.915
AB185-ADL10-79392-01	3.5	>200	>200	52.699	16.998	135.42	-63.414
AB185-ADL1-11512-01	4.3	>200	>200	49.325	5.288	77.198	-61.886
AB185-ADL1-79392-19	4.04	>200	>200	59.181	16.998	135.42	-63.414
AB185	N/A	>200	>200	72.747			

3.5.2 Permeabilidad Caco–2 de ADC carga útil

[1174] Las células Caco–2 se cultivaron durante 21 días en placas Transwell de 24 pocillos a 37 °C, 95% de humedad, 5% de CO_2. La integridad de la monocapa celular fue confirmada por TEER (resistencia eléctrica transepitelial) y amarillo de Lucifer. Las cargas útiles se aplicaron por duplicado a 10 µM, por separado, en ambos lados de la monocapa celular. Las tasas de permeabilidad de la dirección apical a la basolateral (A–B) y de la dirección basolateral a la apical (B–A) se determinaron tomando muestras de alícuotas de ambas cámaras inmediatamente después del tratamiento (t = 0) y luego de la incubación durante 2 horas. Las muestras se precipitaron con proteínas con un solvente orgánico que contenía un estándar interno y se analizaron por LC–MS/MS (SCIEX; API 5500). Las respuestas de relación de área de carga útil/estándar interno a lo largo del tiempo en ambas direcciones se utilizaron para generar valores de permeabilidad (cm/s). La relación de flujo de salida se calculó dividiendo B–A / A–B. Los compuestos de control para baja y alta permeabilidad y flujo de salida se comportaron como se esperaba. Los valores de permeabilidad se reportan en la Tabla 14.

3.5.3 Estabilidad química de la carga útil de ADC

[1175] Las cargas útiles se incubaron en tampón de Mcilvane (fosfato de citrato), pH 5.5 (Boston Bioproducts; # BB–2466) a una concentración final de 20 µM (menos del 0.5% de DMSO a partir de la solución madre). La solución de carga útil y el estándar

interno se pipetearon en placas de 96 pocillos, se ejecutaron en UPLC (Aguas Aquity clase H) y se analizaron para determinar la señal cromatográfica inicial (t = 0). La columna era una columna Aguas UPLC HSS T3 1.8 µm 2.1 x 50 mm (# 186003538). Se empleó un gradiente de fase móvil A del 95% al 10% durante 1 minuto, donde A fue 0.1% ácido fórmico en agua y la fase móvil B fue 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (velocidad de flujo de 0.9 ml/min). El resto de la solución de carga útil se mantuvo en un agitador de placas a 37 °C (Eppendorf ThermoMixer). Los análisis de muestras por UPLC se repitieron a las 24, 72 y 96 horas después de la incubación a 37 °C. La respuesta de relación de área de la carga útil y el estándar interno se determinó para tres puntos temporales: tiempo 0, día 1 y día 3 o día 4. El tiempo 0 se estableció en 100. Las respuestas de relación de área de los últimos puntos temporales se compararon con el tiempo 0. El porcentaje restante se calculó de la siguiente manera: (Relación de Área Día X / Relación de Área Tiempo 0) * 100 = % restante. La pendiente de la línea se calculó en Excel comparando el log del % restante y el punto temporal. Las vidas medias se calcularon en Excel por ln(2)/pendiente y se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares y las correspondientes cargas útiles

			Actividad					Unión SF3B1 carga útil y modulación de empalme de ARNm			Potencia y letalidad de células de carga útil			Permeabilidad de células de carga útil			Estabilidad química de carga útil
ID lote SMLA	Enlazador	DAR	CTGlo Media g GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	Rmin (%) (letalidad máx.)	**Clase carga útil**	**Masa**	SPA-ATS **Media g IC50** (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS **Media g IC50** (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS **Media g IC50** (nM) Ad2.2 HELA.2	CTGlo-ATS **Media g GI50** (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS **Media g LD50** (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS **Media Resp mín** % 72h THP1.1	**Permeabilidad media** Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s)	**Permeabilidad media** Caco-2 B-A Perm (10e-6 cm/s)	**Relación eflujo**	**Estabilidad Media Estabilidad** t1/2 pH5.5 (d)
AB185-ADL5-116378-01	ADL0005-01	6.3	0.038	>113.000	-51.503	Plad D Zwitt	722.917	14.557	243.749	50.858	348.114	2076.811	-77.246	0.137	0.349	2.547	5
AB185-ADL1-79392-24	ADL0001-01	4	0.042	0.447	-78.554	Plad D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL1-110979-01	ADL0001-01	2.8	0.05	>200.000	-75.774	Plad D	664.837	8.778	20.887	17.321	10.943	33.329	-99.957	0.1	1.79	17.9	4.4
AB185-ADL14-79392-01	ADL0014-01	3.5	0.055	>200.000	-59.225	Plad D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL15-79392-01	ADL0015-01	3.2	0.062	>200.000	-60.34	Plad D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL1-110978-01	ADL0001-01	7.2	0.075	1.01	-72.765	Plad D	664.837	5.921	11.403	9.034	8.745	38.969	-99.92	0.128	2.027	15.875	3.525
AB185-ADL12-116902-01	ADL0012-01	4.3	0.078	>80.000	27.157	Plad D Zwitt	708.89	29.188	66.293	49.131	223.348	1594.636	-78.119	0.14	0.16	1.143	
AB185-ADL12-79392-01	ADL0012-01	3.1	0.081	2.148	-85.136	Plad D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL6-79392-01	ADL0006-01	3.8	0.081	2.877	-86.59	Plad D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-105395-01	SMCC	3.3	0.118	2.759	-56	DM1	738.29	>1200.000	>25000.000	>25000.000	0.503	3.287	-93.785	0.38	28.6	75.263	1.3
AB185-ADL12-36483-01	ADL0012-01	3.3	0.126	>200.000	-39.556	Plad D	652.87										

Tabla 14 (continuación). Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares y las correspondientes cargas útiles

			Actividad					Unión SF3B1 carga útil y modulación de empalme de ARNm			Potencia y letalidad de células de carga útil			Permeabilidad de células de carga útil			Estabilidad química de carga útil
ID lote SMLA	Enlazador	DAR	CTGlo Media g GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	Rmin (%) (letalidad máx.)	Clase carga útil	Masa	SPA-ATS Media g IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS Media g IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS Media g IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	CTGlo-ATS Media g GI50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS Media g LD50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS Media Resp min % 72h THP1.1	Permeabilidad media Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s)	Permeabilidad media Caco-2 B-A Perm (10e-6 cm/s)	Relación eflujo	Estabilidad Media Estabilidad t1/2 pH5.5 (d)
AB185-ADL12-116696-01	ADL0012-01	3.2	0.142	>200.000	-61.497	Plad D	638.843	18.251	10.929	8.748	28.336	113.557	-100.664	0.16	0.38	2.375	>7.000
AB185-ADL15-349-01	ADL0015-01	3.3	0.17	>200.000	-25.778	Plad D	650.854	15.533	19.133	15.342	2.015	11.708	-100.218	0.624	14.2	22.756	4
AB185-ADL5-349-07	ADL0005-01	4.1	0.179	>200.000	-19.945	Plad D	650.854	15.533	19.133	15.342	2.015	11.708	-100.218	0.624	14.2	22.756	4
AB185-ADL6-110413-01	ADL0006-01	5.2	0.244	4.206	-95.509	Plad B	648.838	2.117	20.224	18.121	0.87	3.56	-99.938	1.15	16.11	14.009	<1.000
AB185-ADL5-112048-02	ADL0005-01	4	0.254	>200.000	-7.125	Plad D	664.881	9.228	16.317	14.658	1.819	8.454	-99.951	1.81	23.5	12.983	>7.000
AB185-ADL1-110980-01	ADL0001-01	5	0.289	18.948	-95.484	Plad B	648.838	2.085	11.287	8.816	0.892	3.358	-99.941	0.9	17.17	19.078	<1.000
AB185-ADL12-349-01	ADL0012-01	3.6	0.432	>200.000	17.824	Plad D	650.854	15.533	19.133	15.342	2.015	11.708	-100.218	0.624	14.2	22.756	4
AB185-ADL1-116902-01	ADL0001-01	2.9	0.443	>200.000	27.157	Plad D Zwitt	708.89	29.188	66.293	49.131	223.348	1594.636	-78.119	0.14	0.16	1.143	

			Actividad					Unión SF3B1 carga útil y modulación de empalme de ARNm			Potencia y letalidad de células de carga útil			Permeabilidad de células de carga útil			Estabilidad química de carga útil
ID lote SMLA	Enlazador	DAR	CTGlo Media g GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HCC1954.1	Rmin (%) (letalidad máx.)	Clase carga útil	Masa	SPA-ATS Media g IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS Media g IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS Media g IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	CTGlo-ATS Media g GI50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS Media g LD50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS Media Resp min % 72h THP1.1	Permeabilidad media Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s)	Permeabilidad media Caco-2 B-A Perm (10e-6 cm/s)	Relación eflujo	Estabilidad Media Estabilidad t1/2 pH5.5 (d)
AB185-ADL1-116814-01	ADL0001-01	8	0.466	>200.000	-34.274	ArPlad Zwitt	630.758	35.694	33.402	72.404	195.752	5202.992	-53.128	0.13	0.53	4.077	
AB185-ADL5-124-01	ADL0005-01	3.7	0.806	>93.000	-57.844	Plad D	718.973	5.99	10.545	9.364	1.352	8.086	-100.481	0.87	10.56	12.138	3.75
AB185-ADL5-110900-01	ADL0005-01	4	0.912	>200.000	-50.337	ArPlad	668.811	1.648	4.632	4.926	1.017	11.038	-99.595	3.43	26.9	7.843	>7.000
AB185-ADL1-111512-01	ADL0001-01	4.3	0.925	>200.000	3.753	ArPlad	654.784	1.924	10.022	8.586	3.584	25.594	-99.209	0.06	12.13	202.167	>7.000
AB185-ADL5-110419-01	ADL0005-01	4.3	0.943	>200.000	-29	ArPlad	694.849	5.505	18.838	14.314	3.719	28.483	-99.401	15.955	41.125	2.578	>7.000
AB185-ADL1-110728-01	ADL0001-01	4.3	2.086	158.245	-55	ArPlad	680.822	5.564	16.01	15.144	2.975	21.46	-99.681	0.72	23.3	32.361	>7.000
AB185-ADL5-105280-01	ADL0005-01	4	2.668	>160.000	12.42	ArPlad	587.733	1.82	17.943	9.44	2.827	24.908	-99.033	20.25	18.18	0.898	
AB185-ADL1-115286-01	ADL0001-01	3.8	5.994	>200	-8.011	Plad B	620.828	0.99	12.686	12.709	0.863	4.355	-99.621	1.19	27.4	23.025	
AB185-ADL10-79392-01	ADL0010-01	3.5	6.642	>200	8.138	Plad D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95

3.5.4 Ensayo PD de empalme en la célula

[1176] Para examinar el mecanismo de acción de ADC anti–HER2 ejemplares, se examinó el empalme del transcripto maduro SLC25A19 en células HCC1954 tratadas con concentraciones crecientes de ADC.

[1177] Las células HCC1954 (ATCC) se colocaron en placas en RPMI libre de rojo de fenol + 10% medio FBS (ATCC) a razón de 1 x 10^5 células por pocillo a 90 µl por pocillo. Las células se trataron con conjugados en una relación dosis–respuesta de dilución de 3 veces. Después de 24 horas o 6 horas, respectivamente, las células se lisaron con 50 µl de tampón CL (IgePal CA–630, 5M NaCl, 1M Tris HCl 1M pH 7.4 en agua) que contenía 25 µl/ml de RNAsin (Promega) y se incubaron durante 45 minutos a RT en un agitador. La mezcla resultante (0.5 µL) se usó para evaluar la modulación de empalme en una reacción de PCR de transcripción inversa Taqman Fast Virus 1–Paso MasterMix (Applied Biosystems) con los siguientes cebadores Taqman de acuerdo con las recomendaciones del fabricante: SLC25A19 (Invitrogen, Hs00222265_m1); RPLPO (Invitrogen, Hs99999902_m1); 18S (Invitrogen, Hs99999901_s1).

[1178] El control de T–DM1 (trastuzumab con un agente que altera los microtúbulos como carga útil) no afectó el empalme de SLC25A19 (**FIG. 7**). En contraste, los ADC anti–HER2 que demostraron una potente actividad de inhibición del crecimiento en diferentes líneas celulares evaluadas (**FIG. 5**) también demostraron una potente modulación de empalme, lo que indica un mecanismo de acción en el objetivo (**FIG. 7**). Del mismo modo, los ADC anti–HER2 que mostraron una menor potencia en los ensayos de viabilidad celular fueron menos potentes en términos de modulación de empalme.

3.5.5 Ensayo de destrucción de células espectadoras

[1179] La capacidad de los conjugados anti–HER2 ejemplares para destruir tanto las células positivas para el blanco como las células negativas para el blanco adyacentes se midió en un ensayo de destrucción de células espectadoras. NCI–H1568, células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (ATCC), fueron diseñadas para expresar luciferasa. El ADNc se sintetizó en GeneArt (ThermoFisher Scientific) y se clonó en un vector de destino pLVX–EF1a (ThermoFisher Scientific). Por separado, NCI–H1568 se diseñaron para expresar HER2 humano (clonado en pLenti6.3/V5–DEST, ThermoFisher Scientific) utilizando el sistema de transfección viral TransIT® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mirus Bio LLC; # MIR6003). Para evaluar la actividad adicional de los conjugados, se colocaron 2000 células NCI–H1568 positivas para el blanco (transducidas con HER2) y 2000 células NCI–H1568 negativas para el blanco (marcadas con luc) en placas transparentes de fondo redondo y 96 pocillos (Corning) y se incubaron con conjugados dosificados a una dilución en serie de 3 veces por triplicado, 30 – 0.005 nM. En el

momento del tratamiento, se ensayó una placa de células no tratadas utilizando el sistema de ensayo de luciferasa OneGlo® (Promega) y el sistema de ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter–Glo®2.0 (Promega) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, para establecer un tiempo cero (T0). Después de 6 días de cultivo, la población de células restante se analizó mediante el sistema de ensayo de luciferasa OneGlo® (Promega) para medir la fracción de células negativas para el blanco que sobrevivieron. La viabilidad general se midió con el sistema de ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter–Glo® 2.0 (T144). Las curvas de respuesta a la dosis se calcularon como se describe en la sección 2.3.

[1180] El diseño del ensayo de destrucción de células espectadoras permite rastrear solo las células negativas para el blanco, cuya eliminación se basa en la captación del catabolito liberado por las células positivas para el blanco vecinas. Como se discutió anteriormente, las células se colocan en placas en tres condiciones: (1) células negativas para el blanco solas (marcadas con luc); (2) células positivas para el blanco solas; y (3) cocultivo de células negativas y positivas para el blanco. Cuando las placas se leen con reactivo CellTiter–Glo®, se puede hacer un seguimiento de la viabilidad de todas las poblaciones celulares para confirmar la actividad de ADC dependiente de antígeno. En contraste, cuando se usa el reactivo OneGlo®, solo las células negativas para el blanco (marcadas con luc) tendrán una señal.

[1181] Las células negativas para el blanco (marcadas con luc) no fueron sensibles al tratamiento con ADC anti–HER2 cuando se cultivaron por sí mismas (**FIG. 8**). Sin embargo, cuando las células negativas para el blanco se cultivaron con células positivas para el blanco, el tratamiento con ADC anti–HER2 dio lugar a una mayor destrucción de células negativas para el blanco. Estos datos sugieren que las células negativas para el blanco son destruidas más eficazmente por los ADC anti–HER2 cuando se cultivan conjuntamente con células positivas para el blanco, a lo que se hace referencia en este documento como destrucción de células espectadoras. La destrucción de células espectadoras se distingue de la muerte fuera del objetivo, que se define como la destrucción de células negativas para el blanco (antígeno) por sí mismas, en ausencia e independientemente del co–cultivo con células positivas para el blanco.

[1182] En este experimento, AB185–ADL5–D2 demostró una mayor capacidad para matar una población de células cancerosas heterogéneas de antígeno en comparación con AB185–ADL1–D1. Sin limitarse a ninguna teoría, esta diferencia de potencia puede deberse a la adición de un grupo metilo en D2, lo que proporciona un aumento de tres veces en la potencia de la célula de carga útil y la permeabilidad en comparación con D1 (véase la Tabla 14). El ADC D2 trató una población de células cancerosas heterogéneas de

antígeno tan eficazmente como el ADC de control AB185–MC–Val–Cit–MMAE.

3.6 Análisis *in vivo*

[1183] Los ejemplos de ADC anti–HER2 que mostraron una potente modulación de empalme e inhibición del crecimiento celular se evaluaron *in vivo*.

3.6.1 Estudio de eficacia de xenoinjerto HCC1954

[1184] Para investigar la eficacia de ADC anti–HER2 ejemplares en un modelo de xenoinjerto de ratón, las células HCC1954 de carcinoma ductal de mama (ATCC) (10 x 10^6 células/100 µl/1:1 volumen de RPMI:Matrigel) se implantaron subcutáneamente en el flanco de ratones hembra CB17–SCID. Los ratones se trataron con dosis IV en bolo único de los conjugados (formulados en DPBS, pH 7.4) o con control de vehículo. Los animales fueron dosificados en las cantidades indicadas en la **FIG. 9**. Todos los animales fueron monitoreados para determinar el crecimiento del tumor y el peso corporal dos veces por semana hasta que alcanzaron alguno de los siguientes criterios de valoración: (1) volumen excesivo del tumor (calculado mediante la fórmula del elipsoide: (largo x ancho^2)/2); o (2) desarrollo de cualquier problema de salud, como pérdida excesiva de peso corporal. Todos los estudios en animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía de Biomedicina H3 para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

[1185] El tratamiento con ADC anti–HER2 (AB185–ADL5–D2 o AB185–ADL1–D1) en una dosis única de tan solo 2 mg/kg dio por resultado una regresión significativa del tumor (**FIG. 9**). También se observó una respuesta a la dosis para la carga útil conjugada, de modo que los ADC anti–HER2 con valores DAR más altos (DAR ~4) demostraron una mayor eficacia y un rebrote tumoral más lento en relación con el control de anticuerpo T–DM1 en dosis adecuadas. Además, la carga útil dirigida al tumor a través de un ADC fue más potente en relación con la correspondiente carga útil no conjugada.

EJEMPLO 4

[1186] Para determinar si las propiedades de los ADC anti–HER2 ejemplares descritos en el Ejemplo 3 podrían extrapolarse a otros ADC dirigidos a antígenos y/o indicaciones alternativas, las cargas útiles seleccionadas se conjugaron con un anticuerpo anti–CD138 ejemplar (B–B4) y un anticuerpo anti–EPH2A ejemplar (1C1). CD138 se expresa en células plasmáticas malignas, por ejemplo, en el mieloma múltiple, mientras que EPH2A se expresa más generalmente en una variedad de tumores malignos. La preparación y evaluación de ADC anti–CD138 y anti–EPH2A ejemplares se describen a continuación.

4.1 Anticuerpos

[1187] El anticuerpo B–B4 ("AB205") (Tassone *et al.* (2004) Blood 104:3688–96) y el anticuerpo 1C1 ("AB206") (Jackson *et al.* (2008) Cancer Res. 68(22):9367–74) se

utilizaron para la preparación de ADC anti–CD138 y ADC anti–EPH2A, respectivamente.

4.2 Bioconjugación

[1188] El anticuerpo (B–B4 o 1C1) a razón de 10 mg/ml en tampón PBS (pH 7.0) se mezcló con TCEP 5 mM (2–4 equivalentes molares) (ThermoFisher Scientific; nº 77720) para romper los enlaces disulfuro entre cadenas. La reacción se mezcló suavemente a 22 °C durante 3 horas. Luego se añadió propilenglicol (15% v/v) seguido de 8 equivalentes molares de enlazador–carga útil (6 mM de solución madre en DMSO), y la solución se mezcló completamente. La reacción se colocó en una placa rotatoria en una incubadora a 22 °C. Después de una conjugación de 2 horas, la mezcla de reacción se purificó para eliminar la carga útil no conjugada con AKTA GE M150 (columna desalinizadora HiTrapTM 26/10; caudal: 3 ml/min) (GE Healthcare Bio–Sciences) en DPBS (pH 7.5). El conjugado resultante se concentró a través de ultrafiltración Amicon (30 kDa, Ultra–4) (EMD Millipore) y se sometió a filtración estéril a través de un filtro desechable de PVDF de 0.22 µm (EMD Millipore). La solución transparente final se midió mediante UV–VIS para determinar la concentración de anticuerpo ([mAb]; mol/L) y la concentración de carga útil conjugada ([LD]; mol/L) de acuerdo con la ley de Beer–Lambert (A=*E*c*l*) y las siguientes ecuaciones:

$$A_{280nm} = E^{mAb}_{280nm} * [mAb] * l + E^{LD}_{280nm} * [LD] * l$$

$$A_{252nm} = E^{mAb}_{252nm} * [mAb] * l + E^{LD}_{252nm} * [LD] * l$$

E^{mAb}_{280nm}: B–B4 = 224,320 $cm^{-1}M^{-1}$

1C1 = 215,380 $cm^{-1}M^{-1}$

E^{mAb}_{252nm}: B–B4 = 83,670 $cm^{-1}M^{-1}$

1C1 = 80,337 $cm^{-1}M^{-1}$;

E^{LD}_{280nm} = 800 $cm^{-1}M^{-1}$

E^{LD}_{252nm} = 31,000 $cm^{-1}M^{-1}$

Abreviaturas: c – concentración molar; l – longitud de la trayectoria de la luz (Nanodrop: 0.1 cm); *E* – coeficiente de extinción molar; A – absorbancia.

4.3 Caracterización biofísica

[1189] El DAR, el porcentaje de agregación y el porcentaje de carga útil no conjugada se analizaron para determinar los ADC anti–CD138 y anti–EPHA2 ejemplares mediante cromatografía líquida–espectrometría de masas (LC/MS), cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (HPLC), respectivamente. Todos los conjugados descritos aquí contenían menos de 2% de fármaco libre y contenían menos de 10% de agregado.

4.3.1 Análisis por LC/MS – DAR

[1190] El análisis por LC/MS se realizó como se describe en la sección 3.3.1. Los

valores DAR para ADC anti–CD138 y anti–EPHA2 ejemplares se muestran en las Tablas 15–18.

4.3.2 Análisis por SEC – Agregación

[1191] El análisis por SEC se realizó como se describe en la sección 3.3.2. El porcentaje de monómero para ADC anti–CD138 y anti–EPHA2 ejemplares se presenta en las Tablas 15 y 17.

4.3.3 Análisis por HPLC – Fármaco libre

[1192] El análisis por HPLC se realizó como se describe en la sección 3.3.3. El porcentaje de fármaco libre para los ADC anti–CD138 y anti–EPHA2 ejemplares se informa en las Tablas 15 y 17.

4.4 Análisis *in vitro*

4.4.1 Viabilidad celular

[1193] Los ADC anti–CD138 se analizaron en la línea celular de mieloma múltiple MOLP8 que expresa CD138. De manera similar, los ADC anti–EPHA2 se evaluaron en la línea celular de cáncer de próstata PC3 que expresa EPHA2. El análisis de viabilidad celular se realizó como se describe en la sección 2.3.

[1194] La conjugación de la carga útil con el anticuerpo anti–CD138 (**FIG. 10** y Tabla 16) y el anticuerpo anti–EPHA2 (**FIG. 11** y Tabla 18) dio como resultado tendencias similares a las analizadas en la sección 3.5.1 para ADC anti–HER2. En particular, los ADC con ciertos enlazadores (por ejemplo, ADL12) y/o cargas útiles (por ejemplo, D1, D25, D4) demostraron la mayor potencia en las células que expresan antígeno. Consistentemente, las cargas útiles alternativas (por ejemplo, D14) fueron menos capaces de inhibir el crecimiento celular a través de la administración mediada por anticuerpo, a pesar de ser moléculas pequeñas potentes.

Tabla 15. Caracterización de ADC anti–CD138 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enlazador	DAR	% monómero	Fármaco libre %	Concentración (mg/ml)
AB205-ADL1-111512-01	Aril	ADL0001	2.900	92.000	<2	1.010
AB205-ADL5-110900-01	Aril	ADL0005	2.800	95.000	<2	1.060
AB205-ADL5-115517-01	Plad B	ADL0005	4.900	95.000	<2	0.880
AB205-ADL1-79392-01	Plad D	ADL0001	5.000	98.000	<2	0.620
AB205-ADL1-110979-01	Plad D	ADL0001	4.800	98.000	<2	1.010
AB205-ADL5-116378-01	Plad D Zwitt	ADL0005	6.400	98.000	<2	0.890
AB205-ADL10-79392-01	Plad D	ADL0010	3.400	96.000	<2	0.750

Tabla 15 (continuación). Caracterización de ADC anti–CD138 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enlazador	DAR	% monómero	Fármaco libre (%)	Concentración (mg/ml)
AB205-ADL12-79392-01	Plad D	ADL0012	3.800	97.000	<2	0.830
AB205-ADL12-349-01	Plad D	ADL0012	3.300	97.000	<2	0.970

Tabla 16. ADC anti–CD138 ejemplares – células MOLP8

	SMLA				Carga útil		
Muestra	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
AB205-ADL1-79392-01	5	<0.061	0.656	-100.099	6.885	25.712	-100.248
AB205-ADL5-110900-01	2.8	0.268	>400	2.419	0.776	9.178	-100.198
AB205-ADL5-115517-01	4.9	<0.061	>400	-46.23	0.84	4.58	-62.2
AB205-ADL10-79392-01	3.4	0.08	>400	-25.099	6.885	25.712	-100.248
AB205-ADL12-79392-01	3.8	<0.061	0.168	-99.851	6.885	25.712	-100.248
AB205-ADL12-349-01	3.3	<0.061	>400	-53.125	0.316	5.035	-100.198
AB205-ADL1-111512-01	3	<0.061	>400	-74.008	1.9	8.5	-61
AB205-ADL1-110979-01	4.8	<0.061	0.535	-99.306	1.151	12.99	-101.935
AB205-ADL5-116378-01	6.4	<0.061	11.669	-76.736	149.874	>400	5.94

5

Tabla 17. Caracterización de ADC anti–EPHA2 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enlazador	DAR	% monómero	Fármaco libre (%)	Concentración (mg/ml)
AB206-ADL1-79392-01	Plad D	ADL0001	5.600	99.000	<2	2.060
AB206-ADL5-349-01	Plad D	ADL0005	6.300	99.000	<2	1.900
AB206-ADL1-110979-01	Plad D	ADL0001	6.000	95.000	<2	1.140
AB206-ADL1-110978-01	Plad D	ADL0001	6.500	95.000	<2	1.660
AB206-ADL1-111512-01	Aril	ADL0001	3.600	80.000	<2	1.620
AB206-ADL5-115517-01	Plad B	ADL0005	4.600	97.000	<2	0.960
AB206-ADL5-110900-01	Aril	ADL0005	4.200	95.000	<2	0.820

Tabla 17 (continuación). Caracterización de ADC anti–EPHA2 ejemplares

ID lote SMLA	Clase carga útil	Enlazador	DAR	% monómero	Fármaco libre (%)	Concentración (mg/ml)
AB206-ADL5-116378-01	Plad D Zwitt	ADL0005	5.000	96.000	<2	1.130
AB206-ADL10-79392-01	Plad D	ADL0010	2.700	97.000	<2	1.620
AB206-ADL12-79392-01	Plad D	ADL0012	6.400	90.000	<2	0.670
AB206-ADL12-349-01	Plad D	ADL0012	6.300	90.000	<2	0.850

Tabla 18. ADC anti–EPHA2 ejemplares – Células PC3

	SMLA				Carga útil		
Muestra	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
AB206-ADL1-110978-01	6.5	0.175	95.51	-68.678	16.622	177.783	-68.37
AB206-ADL1-110979-01	6	<0.061	2.732	-69.096	11.057	>400	-55.97
AB206-ADL1-111512-01	3.6	3.046	>400	-49.267	3.877	>400	-79.835
AB206-ADL12-79392-01	6.4	0.808	>400	-64.516	13.291	>400	-71.987
AB206-ADL12-349-01	6.3	78.977	>400	17.376	2.391	>400	-68.803
AB206-ADL5-115517-01	4.6	71.73	>400	19.765	1.41	>400	-29.33
AB206-ADL10-79392-01	2.7	>400	>400	43.796	13.291	>400	-71.987
AB206-ADL5-110900-01	4.2	9.959	>400	2.441	3.877	>400	-79.835
AB206-ADL5-116378-01	5	28.078	>400	20.041	>400	>400	77.524
AB206-ADL1-79392-01	5.6	<0.061	>400	-59.643	13.291	>400	-71.987
AB206-ADL5-349-01	6.3	1.003	>400	16.465	2.391	>400	-68.803

EJEMPLO 5

[1195] La estabilidad *in vitro* y/o *in vivo* de ADC anti–HER2 ejemplares se evaluó como se describe a continuación.

5.1 Anticuerpo total y carga útil conjugada de AB185–ADL1–D1 en plasma

[1196] Tras el tratamiento *in vitro* (sección 5.1.1) o el tratamiento *in vivo* (sección 5.1.2) con AB185–ADL1–D1, se cuantificaron los niveles de anticuerpo total (TAb) y carga útil conjugada (CP) en plasma por la técnica de LC/MS/MS de inmunoprecipitación. El ajuste de la cuantificación fue lineal con una ponderación de $1/x^2$ de 0.5 a 100 µg/ml y de

0.5 a 500 ng/ml en plasma de ratón para TAb y CP, respectivamente. Las muestras de plasma se mezclaron con estándar interno de anticuerpo humano monoclonal universal marcado con isótopos estables (SIu™ MAB, Sigma, St. Louis, MO) y PBS 10 mM, pH 7.4, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Se agregaron a la mezcla perlas magnéticas de estreptavidina T1 Dynabeads® MyOne™ (ThermoFisher Scientific) y se incubaron durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Se usó un soporte magnético para unir las perlas, que se lavaron secuencialmente con tampón CHAPS y luego con tampón PBS. Los analitos de interés se eluyeron de las perlas con HCl 30 mM. Se utilizaron alícuotas de eluyente separadas para cuantificar TAb o CP. Para TAb, se añadió Tris–HCl, pH 8.3, seguido de tripsina y se dejó incubar durante la noche a 37 °C. Para CP, se añadió acetato de amonio 1M, seguido de un estándar interno de carga útil deuterada y catepsina B, y se dejó incubar durante la noche a 25 °C. Las muestras se analizaron por LC/MS/MS y se cuantificaron utilizando la relación de área de analito a estándar interno y se compararon con la curva de calibración respectiva. Para calcular la concentración de CP, la concentración de TAb se corrigió para los pesos moleculares de la carga útil, el peso molecular de AB185–ADL1–D1 y DAR (relación fármaco–anticuerpo).

5.1.1 Estabilidad *in vitro* de AB185–ADL1–D1 en plasma de ratón, rata y mono

[1197] El plasma combinado (Bioreclamation) de ratón, rata y mono, y PBS se combinaron con AB185–ADL1–D1 (4.81 mg/ml) para lograr una concentración final de 50 µg/ml. Las muestras se incubaron a 37 °C, 95% de humedad, 5% de CO_2 durante 4 días de manera de estabilizar el pH y minimizar la unión no específica y la evaporación. Se tomaron alícuotas a las 4, 24, 48, 72 y 96 horas, y se almacenaron a –70 °C hasta el procesamiento. Las muestras se descongelaron y procesaron para el bioanálisis utilizando los métodos descritos anteriormente (sección 5.1) para el anticuerpo total y la carga útil conjugada. El tiempo 0 se fijó en 100% para cada matriz. Las respuestas de relación de área de los últimos puntos temporales se compararon con el tiempo 0 por separado para cada matriz. El porcentaje restante se calculó de la siguiente manera: (Relación de Área Día X / Relación de Área Tiempo 0) * 100 = % restante. La pendiente de la línea se calculó en Excel comparando el log del % restante y el punto temporal. La vida media se calculó en Excel por ln(2)/pendiente.

[1198] El anticuerpo total de AB185–ADL1–D1 demostró ser estable en el tampón y en todas las especies de plasma, exhibiendo solo una precipitación moderada durante 4 días (**FIG. 12A**). Los niveles de D1 de carga útil conjugada (intacta) se mantuvieron durante 4 días (**FIG. 12B**).

5.1.2 Farmacocinética (PK) instantánea en plasma de ratón después de una dosis IV única de AB185–ADL1–D1

[1199] Los ratones (CB17–SCID) se trataron con una dosis IV única de AB185–ADL1–D1 a razón de 10 mg/kg o 20 mg/kg, seguida de colecciones terminales (por punción cardíaca) en tubos de litio–heparina (n = 3 por punto temporal por grupo de dosis) a las 24, 48 y 72 horas después de la dosis. La sangre se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm a 4 °C para eliminar los glóbulos rojos y el plasma se almacenó a –80 °C hasta el procesamiento. Las muestras se descongelaron y procesaron para el bioanálisis utilizando los métodos descritos anteriormente (sección 5.1) para el anticuerpo total y la carga útil conjugada.

[1200] Después de una dosis IV única de AB185–ADL1–D1, más de 400 ng/ml de carga útil de D1 intacta permanecieron conjugados con el anticuerpo AB185 a las 72 horas posteriores a la dosis (**FIG. 13**). El ADC AB185–ADL1–D1 demostró una estabilidad mejorada en comparación con un ADC alternativo que llevaba una carga útil con un mecanismo de acción similar. El ADC basado en tailanstatina A reportado en Puthenveetil *et al.* (Bioconjugate Chem. (2016) 27:1880–8) es relativamente menos estable y muestra una bioconversión completa de la carga útil a las 72 horas (es decir, el acetato es completamente hidrolizado).

5.2 Pruebas de estabilidad acelerada de AB185–ADL14–D1 y AB185–ADL5–D25

[1201] Los SMLA recién producidos (~1 mg cada uno en tubos Eppendorf, 4~5 mg/ml) se centrifugaron y se midieron mediante absorción UV (NanoDrop) a 280 nm para determinar las concentraciones de proteína. Las muestras se incubaron luego en un baño de agua a 37 °C y se tomaron muestras en cuatro puntos temporales: 0 (recién preparado), 1 día, 2 días y 4 días. Las muestras tomadas en diferentes puntos temporales se almacenaron a –80 °C hasta que se completó el último muestreo. Después de descongelar a 22 °C, las muestras se analizaron por SEC, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y MS de fase inversa (RP–HPLC) para la cuantificación de agregación de anticuerpo/fragmentos, y DAR. El porcentaje de agregación, concentración y valores DAR (HIC y RP–HPLC) para AB185–ADL14–D1 y AB185–ADL5–D25 en cuatro puntos temporales se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Prueba de estabilidad acelerada de ADC anti–HER2 seleccionados

ADC	Tampón almacenamiento	Días a 37 C	Agregación (%)	Concentración (mg/ml)	DAR	
					HIC	RP-HPLC
AB185-ADL14-79392	DPBS(pH 7.5)	0	0.68	4.99	4.3	4.32
		1	1.18	4.98	4.29	4.31
		2	1.31	5.12	4.33	4.32
		4	2.08	5.02	4.28	4.27
AB185-ADL5-116378	DPBS(pH 7.5)	0	0.84	5.05	4.54	4.22
		1	1.14	4.16	4.44	4.19
		2	1.41	4.52	4.74	4.19
		4	2.43	3.98	4.64	4.12

EJEMPLO 6

[1202] Para determinar si las células tratadas con ADC basados en modulador de empalme (es decir, los ADC ejemplares descritos aquí) podrían producir neoantígenos adecuados para cebar células T vírgenes para la transición a células efectoras (es decir, células efectoras capaces de dirigirse a dichos neoantígenos), se realizaron los siguientes experimentos.

6.1 Secuenciación de ARN y experimento de ligandoma de proteínas

6.1.1 Descripción general

[1203] Los cambios en el transcriptoma fueron interrogados después del tratamiento con ADC. Dos líneas celulares que sobreexpresan HER2, una línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas modificada (NCI–H1568) y una línea de cáncer de mama amplificada con HER2 (HCC1954), se trataron con ADC (AB185–ADL1–D1) en concentraciones destinadas a disparar un empalme de ARNm aberrante robusto (4 nM y 1.3 nM, respectivamente). Los experimentos de RNAseq se realizaron a las 24 horas después del tratamiento. Estos experimentos demostraron que múltiples transcriptos de ARNm exhibían patrones de empalme alterados.

[1204] Para luego preguntar si los transcriptos identificados se podrían traducir y presentar como neoantígenos en complejos de células tumorales MHC1, se seleccionó un punto temporal que permitiría la traducción de los transcriptos de ARNm, pero que precedería los efectos de citotoxicidad extensa (ya que pueden afectar la recolección de material celular para análisis). Las líneas celulares NCI–H1568 y HCC1954 se trataron luego con ADC a 3 nM durante 48 horas y el peptidoma unido a MHC1 se analizó mediante LC–MS/MS. Los datos de peptidoma se filtraron por tamaño de péptido primario a fragmentos de 8–14 aminoácidos (definidos como los criterios de límite de tamaño para la unión a MHC1) y luego se filtraron contra proteínas humanas conocidas. Los péptidos identificados se caracterizaron como antígenos propios, independientemente de en qué condiciones y en qué línea celular se detectaron. Todas las secuencias de péptidos

restantes se mapearon frente a traducciones de 3 cuadros de los datos de RNAseq. Usando criterios estrictos para evaluar las secuencias de péptidos (incluida la exclusión de: cualquier péptido identificado en cualquier muestra no tratada, cualquier péptido que no estuviera codificado en el marco de lectura abierto canónico, y cualquier péptido que no estuviera codificado por una parte que abarca la unión al exón del ARNm donde se alteraron las uniones al exón mediante el tratamiento con AB185–ADL1–D1), se identificaron cuatro neopéptidos unidos a MHC1. Para un esquema de un ejemplo de secuenciación de ARN y un experimento de ligandoma de proteínas, véase la **FIG. 14**.

6.1.2 Métodos detallados

6.1.2.1 Secuenciación de ARN de células tratadas con ADC

[1205] Las células NCI–H1568 (ATCC) que sobreexpresan HCC1954 y HER2 se colocaron en placas a razón de 1 x 10^5 células por pocillo individual de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos (Corning). Las células se trataron con solución salina tamponada con fosfato o AB185–ADL1–D1 a 1.3 nM y 4 nM, respectivamente, durante 24 horas. El ARN total se extrajo de las células con un kit RNAeasy Mini (Qiagen) y se evaluó su calidad y cantidad (kit RNA 6000 Nano LabChip en un bioanalizador 2100, ambos de Agilent). Las bibliotecas de ARN–Seq seleccionadas por poli–A se prepararon de acuerdo con los protocolos estándar de Illumina. Se comprobó la calidad de las bibliotecas de cDNA y se cuantificaron utilizando el kit DNA–1000 en un Bioanalyzer 2100 (ambos de Agilent). Las bibliotecas se agruparon y se secuenciaron en un HiSeq2000 (Illumina) para obtener lecturas de extremos emparejados de 101 bases.

[1206] Las lecturas de secuencia sin procesar se alinearon con la secuencia de referencia humana hg19 mediante STAR 2.4.2a utilizando una alineación de dos pasajes 35, y la cuantificación de isoformas se realizó utilizando Kallisto 0.42.4 (Bray *et al.* (2016) Nat Biotechnol. 34(5):525–7) contra la anotación GENCODE v 25 asignada a GRCh37. La estimación del recuento de intrones retenidos se realizó definiendo 6 nt (−3 nt desde el sitio de empalme y +3 luego del sitio de empalme) regiones límite de exón–intrón y contando las alineaciones, que se superponen completamente a las regiones. Todos los recuentos de unión sin procesar, incluidos los de los límites exón–intrón, se combinaron en todas las réplicas técnicas por cohorte. El uso de unión diferencial se evaluó mediante una prueba binominal z para las diferencias en la proporción entre grupos de muestras tratadas y no tratadas. Las proporciones se calcularon sobre la base de todas las uniones de empalme (y los límites exón–intrón) que compartían un sitio de empalme, similar al porcentaje empalmado en la medición (PSI). Para preservar las suposiciones gaussianas, solo se consideraron para el análisis aquellos sitios de empalme compartidos con recuento total de unión (recuento total de la suma de todos los cruces que comparten ese sitio de

empalme) mayor o igual a 10 lecturas en cohortes tratadas y no tratadas. Las puntuaciones z correspondientes a un valor q corregido por tasa de descubrimiento falso (FDR) de ≤0.05 para uniones tratadas ('aberrantes') y ≤0.20 para uniones no tratadas ('canónicas') se consideraron significativas.

[1207] Dos o más uniones de empalme que comparten un sitio de empalme y tienen al menos una unión que está significativamente sobrerregulada en las muestras tratadas o al menos una unión que está significativamente sobrerregulada en las muestras no tratadas se consideraron uniones aberrantes o canónicas, respectivamente. Se requería que tanto las uniones aberrantes como las canónicas estuvieran presentes en un evento para que se considerara empalme diferencial. En el caso de eventos de retención de intrones, tanto los límites exón–intrón (sitios de empalme 5′ y 3′) como la unión que une a los dos debían ser significativos.

6.1.2.2 Peptidoma unido a MHC1 de células tratadas con ADC

[1208] Las células NCI–H1568 (ATCC) que sobreexpresan HCC1954 y HER2 se sembraron a razón de 1 x 10^8 células en placas de cultivo de tejidos de 15 cm^2 (Corning). Las células se trataron con solución salina tamponada con fosfato o AB185–ADL1–D1 a 3 nM durante 48 horas. Las células se retiraron mecánicamente de las placas y se procesaron según Bassani–Sternberg *et al.* ((2015) Mol Cell Proteomics 14(3):658–73). Brevemente, el procedimiento incluyó la solubilización de los complejos de proteínas MHC–1 a partir de las membranas celulares, el enriquecimiento de la proteína MHC–1 junto con sus péptidos unidos por inmunoprecipitación, la elución selectiva y purificación de péptidos unidos, y la identificación y cuantificación de péptidos por análisis LC/MS/MS. Para la inmunoprecipitación, se utilizó el anticuerpo monoclonal W6/32 purificado a partir de su línea celular de hibridoma HB–95TM. Los análisis espectrométricos de masas se realizaron en un instrumento Q Exactive HF. Los archivos sin procesar adquiridos en este estudio se procesaron con el paquete de software MaxQuant (versión 1.5.7.13) para la identificación y cuantificación de péptidos y proteínas utilizando una base de datos de secuencias de proteínas humanas (versión 22017). Además de esta base de datos, se incluyeron variantes de transcriptos predichas basadas en experimentos RNAseq de células HCC1954 y NCI–H1568 tratadas con AB185–ADL1–D1. MaxQuant realiza la traducción de 6 cuadros e integra las secuencias peptídicas obtenidas para hacer coincidir con los espectros de MS^2. Los datos se filtraron adicionalmente de forma manual para las secuencias peptídicas únicas para muestras tratadas con AB185–ADL1–D1, así como para los péptidos codificados por uniones de empalme de ARNm moduladas por tratamiento con AB185–ADL1–D1 (**FIG. 14**). Se identificaron cuatro neopéptidos mediante un filtrado de alta rigurosidad de los datos de RNAseq y ligandoma de MHC–1. Estos fueron

codificados por cuatro genes. Las secuencias de proteínas de los cuatro neopéptidos, referidas en este documento como Neoantígeno 1, Neoantígeno 2, Neoantígeno 3 y Neoantígeno 4, se ampliaron para los siguientes experimentos para desencadenar el cebado de células inmunes. La secuencia proteica extendida incorpora tanto la secuencia neopeptídica misma como las secuencias de aminoácidos flanqueantes. La secuencia proteica extendida facilita mejor la captación de proteínas por las células dendríticas y permite la presentación de antígenos y el cebado de células T en modelos con diferentes isotipos de HLA.

6.2 Experimento de cebado de células T

6.2.1 Descripción general

[1209] Este experimento fue una reconstitución *in vitro* de las interacciones que se producen en los órganos linfáticos secundarios humanos normales (por ejemplo, ganglios linfáticos que drenan tumores). En este experimento, se aislaron monocitos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se indujeron a diferenciarse en células dendríticas (DC) mediante el cultivo en un cóctel de citoquinas. Tras la diferenciación a DC maduras, las DC maduras se cultivaron con secuencias de neopéptidos extendidas. Durante el cultivo, las DC maduras toman los péptidos, los procesan en fragmentos y los presentan en el MHC1 para el cebado de las células T CD8. Las DC se mezclaron luego con PBMC adicionales del mismo donante y se incubaron durante aproximadamente 2 semanas en un cóctel de citoquinas para estimular la activación de las células T CD8. Después de la incubación, las células se transfirieron a una placa ELISpot que se había recubierto con los péptidos utilizados para el cebado y la reestimulación de las células T CD8 se controló mediante la secreción de IFNγ. La placa ELISpot se procesó y se formó una imagen, y se contaron las manchas de IFNγ para estimar el número de células T CD8 activas. Para un esquema de un ejemplo de experimento de cebado de células T, véase la **FIG. 15**.

6.2.2 Métodos detallados

6.2.2.1 Cebado de células T mediado por neoantígeno y ELISpot de activación

[1210] Se adquirieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a granel de múltiples proveedores (StemExpress, HemaCare, Precision Medicine) y se usaron para generar células T CD8+ reactivas al antígeno según Wölfl y Greenberg ((2014) Nat Prot. 9(4):950–66; **FIG. 15**). Brevemente, las PBMC congeladas (5 x 10^7 células) se descongelaron y se colocaron en placas sobre plástico de cultivo de tejidos T–75 (Corning) en RPMI1640, suplementado con 5% de suero humano AB y 1% de penicilina / estreptomicina durante 2–3 horas. Las células no adherentes se eliminaron y desecharon, y las células adherentes se cultivaron en RPMI1640 / 5% de suero humano, suplementado

con 20 ng/ml de GM–CSF y 20 ng/ml de IL–4 durante 5 días. El día 6, el medio se complementó adicionalmente con 20 ng/ml de TNF–α. El día 7, las DC maduras se recogieron, contaron y cargaron con neopéptidos que se identificaron a partir de experimentos con peptidoma MHC1 (**FIG. 16**). Las células se separaron y se cargaron con cada péptido a una concentración final de 10 µg/10^6 células/ml y se incubaron durante 1 día. El día 8, las DC se trataron con mitomicina C a 20 µg/ml durante 30 minutos y se lavaron exhaustivamente. Al mismo tiempo que el tratamiento de las DC, se descongelaron 10^8 PBMC emparejadas y se lavaron con RPMI1640. Luego se mezclaron las PBMC con las DC en una proporción de 10:1 en 10 ml de RPMI1640 / 5% de suero humano AB, suplementado con IL–21 a 30 ng/ml en matraces T25. Después de 3 días de cocultivo (día 11), se agregaron 10 ml adicionales de medio fresco y se suplementó con IL–7 e IL–15 a una concentración final de 5 ng/ml. Después de 3 días más de cocultivo (día 14), se agregaron 10 ml adicionales de medio fresco, suplementado con IL–7 e IL–15 a una concentración final de 5 ng/ml, y el cocultivo se movió a un matraz T–75. El día 17, se agregaron 20 ml adicionales de medio, suplementado con IL–7 e IL–15 a una concentración final de 10 ng/ml, y las células se transfirieron a un matraz T–175. El día 20, se recogieron las células y se realizó el ensayo ELISpot según las instrucciones del fabricante (R&D Systems). Los pocillos se precargaron utilizando péptido a 10 µg/ml de concentración final por pocillo, densidad celular a 2 x 10^5 células por pocillo, siembra por duplicado e incubación durante la noche. Las manchas de IFNγ se desarrollaron y leyeron en un lector AID ELISpot según las instrucciones del fabricante (**FIGS. 17A–D**).

[1211] Los datos ejemplares de los experimentos de cebado de antígenos se muestran en las **FIGS. 17A–D**. Los lotes de PBMC derivadas de donantes se diferenciaron en DC y se cebaron con neopéptidos como se describe en la **FIG. 15**. El análisis de los datos de ELISpot muestra que, en PBMC de donantes sanos, el cebado de células T vírgenes mediante neopéptidos presentadores de DC puede dar como resultado la expansión y maduración específicas de antígeno de poblaciones de células T efectoras (CD8). Estas poblaciones de células T exhiben reactivación específica de antígeno, como lo demuestra la secreción de IFNγ solo en presencia del péptido antigénico y no en presencia de péptidos no cebadores.

RT–qPCR

[1212] El ARN se purificó a partir de líneas celulares utilizando RNeasy Mini con tratamiento con DNaseI (Qiagen) y 1–2 µg de ARN transcrito en forma inversa utilizando transcriptasa inversa Superscript VILO (ThermoFisher Scientific) en 20 µL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados de ARN se aislaron y se transcribieron de manera inversa utilizando el kit TaqMan Gene Expression Cells–to–CT (ThermoFisher

Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa se realizó utilizando la mezcla TaqMan Gene Expression Master Mix (ThermoFisher Scientific) con sondas de transcripción que apuntan a uniones neoantigénicas duplicadas con ARN VIC–PL de *GAPDH* (ThermoFisher Scientific) y se cuantificó utilizando el método *ΔΔCt*.

Ejemplo 7

7.1 Secuenciación de ARN y experimento de ligandoma de proteínas

7.1.1 Métodos

[1213] La secuenciación de ARN y el experimento de ligandoma de proteínas se realizaron como se describe en el Ejemplo 6 (Sección 6.1). Para un esquema de un ejemplo de secuenciación de ARN y experimento de ligandoma de MHC1, véase la **FIG. 14**.

7.1.2 Resultados

[1214] Se identificaron veintinueve neopéptidos mediante un filtrado de alta rigurosidad de los datos de RNAseq y ligandoma unido a MHC1 (Tabla 20). Se seleccionaron cuatro neopéptidos y se ampliaron para los siguientes experimentos sobre activación del cebado de células inmunitarias. Los cuatro neopéptidos seleccionados se muestran en negrita en la Tabla 20.

Tabla 20. Neopéptidos

Neopéptido		**SEQ ID NO**	**Unión (HG19)**	**Gen**	**Tipo de evento**	**Observado en**
1	SPTLPPRSL	37	chr12:49663470–49663610:+	TUBA1C	Retención de intrón	H1568
2	HPSIKRGLSSL	38	chr12:42729776–42781257:+	PPHLN1	Omisión de exón	H1568
3	LLLPHHVL	39	chr12:49663470–49663610:+	TUBA1C	Retención de intrón	H1568
4	RTAPGVRPPF	40	chr14:35182767–35183743:–	CFL2	Retención de intrón	H1568
5	RPQKSIQAL	41	chr10:28822963–28823162:+	WAC	Retención de intrón	H1568
6	APAPPPLPA	42	chr17:80009840–80011149:+	GPS1	Retención de intrón	H1568
7	RPRPSFPVSL	43	chr7:55087058–55134942:+	EGFR	Retención de intrón	H1568
8	RPKHGDGFSL	44	chr11:57472287–57472444:–	MED19	Retención de intrón	H1568
9	GPAPGKTGL	45	chr7:75932393–	HSBP1	Retención de intrón	H1568

			75933118:+			
10	**EAARKGNSL**	**46**	**chr1:53480715–53504588:+**	**SCP2**	**Omisión de exón**	**H1568**
11	**RIKEKIEEL**	**47**	**chr9:72897499–72912881:+**	**SMC5**	**Omisión de exón**	**H1568**
12	**EIKKRFRQF**	**48**	**chr1:28531860–28541450:–**	**DNAJC8**	**Omisión de exón**	**H1568**
13	**HESAAMAET**	**49**	**chr11:102272937–102323254:–**	**TMEM123**	**Omisión de exón**	**HCC1954**
14	ALKLKQVGV	50	chr1:153610924–153617539:+	CHTOP	Omisión de exón	H1568
15	DLKKRHITF	51	chr13:41323417–41331008:–	MRPS31	Omisión de exón	H1568
16	DVKRNDIAM	52	chr1:41213277–41218822:+	NFYC	Omisión de exón	H1568
17	IPSDHILTPA	53	chr6:149718900–149720239:+	TAB2	Omisión de exón	H1568
18	TVFSTSSLK	54	chr11:61197654–61213412:+	SDHAF2	Omisión de exón	H1568
19	ITSCLLNF	55	chr5:137892555–137893090:–	HSPA9	Retención de intrón	H1568
20	RASPVRGQL	56	chr7:75677544–75677893:+	MDH2	Retención de intrón	H1568
21	VVRKPVIAL	57	chr1:36923582–36929406:–	MRPS15	Omisión de exón	H1568
22	LLSEKKKIS	58	chr6:31750622–31750872:–	VARS	Retención de intrón	H1568
23	APASKPRPRL	59	chr19:3573798–3574380:+	HMG20B	Retención de intrón	H1568
24	RYGQLSEKF	60	chr19:33076813–33078158:+	PDCD5	Omisión de exón	HCC1954
25	VYISNVSKL	61	chr3:53920961–53925796:–	SELK	Omisión de exón	HCC1954
26	LPTKETPSF	62	chr2:85133241–85133394:+	TMSB10	Alt 3’ss	HCC1954

27	GEAPPPPPA	63	chr17:80223672–80231181:–	CSNK1D	Retención de intrón	HCC1954
28	LEEISKQEI	64	chr17:27804724–27807385:+	TAOK1	Omisión de exón	HCC1954
29	IYNHITVKI	65	chr4:2886393–2896308:+	ADD1	Omisión de exón	HCC1954

[1215] Las secuencias de proteínas de los veintinueve neopéptidos fueron extendidas. La secuencia proteica extendida incorpora tanto la secuencia neopeptídica misma como las secuencias de aminoácidos flanqueantes. La secuencia proteica extendida facilita mejor la captación de proteínas por las células dendríticas y permite la presentación de antígenos y el cebado de células T en modelos con diferentes isotipos de HLA. Las secuencias de aminoácidos de los veintinueve neopéptidos extendidos se exponen en la Tabla 21.

Tabla 21. Secuencias de aminoácidos de neopéptidos extendidos

Gen	**SEQ ID NO**	**Secuencia de aminoácidos de neopéptidos extendidos***
TUBA1C	66	VDLEPTVIGELTSVTQVRSQGAGTGGLSWGGSAGHSPTLPPRSLSLLLLPHHVLQMKFALALTASSSTLSNSSQARKMLPITMPEGTTPLARRSLTSCWTEFASWLTSAPVFRASWFSTALVGELVLGSPRCSWNVSQLIMARSPSWSSPFTRRPRFPQL
PPHLN1	67	APPRSHPSIKRGLSSL
CFL2	68	MVRRARWPGGRGEARKAPRTAPGVRPPF
WAC	69	WVNCLFVSGRAAAGGGGGGAVPPILELAGPPFLLLTLIRIGLGRRSGRAGGRAGTQCGGERGPGFAAFRPLRPFRRLRVCAVCVRGSALGRSVGLPRGGAAGAPFSSSPAPHPRRVLCRCLLFLFFSCHDRRGDSQPYQVPAEAGVEGLEGAGGGREGLLLERRPQKSIQALRCNTSETSTADPLKIPGLVPLALSSKV
GPS1	70	MPLPVQVFNLQVTSRGRPGPPRPRAPRHWGRAEVEQGRGACARSRSGTLRAGPPRAARVGGCRAEGASPPWLRAAIGGRRAAPAPPPLPAAHGRGSRPPRR
EGFR	71	QPAQPRTGAPARRPRPRPSFPVSLRSAAPPTGTAGGTGRFVLRPGESGAGGGGDAWDTGLQARRGTAAGTSGAPNRSQLSSLTFPAQLRRIGVSGRKPGAGGRLGPGSRTCAPRCLPRARRGPGAHPRGGRCPPAETALFREAEEGTQKYSLPSDPAGQAAF
MED19	72	FRLHTGPVSPVGGRRQMGRPKHGDGFSLQVCSFIMEQNG
HSBP1	73	GVVEITGEPPCSCRGEEEASRAGRAGGVRLKRGSRGPGELNV

		GPAPGKTGLLIPLLRNWECGSLLRALSAL
SCP2	74	KMGFPEAARKGNSL
SMC5	75	LEARIKEKIEELQQALI
DNAJC8	76	EIKKRFRQFKQAVYKQ
TMEM123	77	AHESAAMAETLQHVPS
CHTOP	78	NRPSVQAALKLKQVGV
MRPS31	79	KTDDLKKRHITFTLGCGIC
NFYC	80	MKLDEDVKRNDIAMAI
TAB2	81	NSISQIPSDHILTPALFITFMTILDL
SDHAF2	82	TVFSTSSLKLNQPQKILKMKSWPC
HSPA9	83	AEEDRRKKVITSCLLNFNLSKAQS
MDH2	84	RSFSTSAQVGQTRGGLQAEAPRPGPRASPVRGQL
MRPS15	85	RGYVVRKPVIALSVKI
VARS	86	VDMDFGTGGQGAGPVGRGKDWSCTLAVHLLSEKKKISFSQI DRAWGGSQGTVLDKWGPGVVSELHPSAKEVSVGRNSVESL MTWAS
HMG20B	87	EKGSHEEEVRVPALSWGRPRAPAPASKPRPRLDLNCLWLRP QPIFLWKLRPRPVPAATPLTGPLPL
PDCD5	88	RYGQLSEKFNRRKVMDS
SELK	89	MVYISNVSKLCFSKM
TMSB10	90	NTLPTKETPSFLLNPHTSWVPRPHREAPRLRVGVAAPLQRPL PALHSH
CSNK1D	91	FGDIILGEAPPPPPAARRPGPCGCQDQARSRKEVVAPAGSPR KSRHRRIVARTQRPLG
TAOK1	92	GSASDLLEEISKQEISF
ADD1	93	QLIYNHITVKINLQGD

* El subrayado indica aminoácidos derivados del marco de lectura abierto de transcripto canónico (es decir, la secuencia peptídica canónica).

7.2 Experimento de cebado de células T

7.2.1 Descripción general

[1216] Para un esquema de un ejemplo de experimento de cebado de células T, véase la **FIG. 15**.

7.2.2 Materiales

[1217] Materiales usados para el cebado de células T:

- Medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Cat. Nro. A10491–01)

- Penicilina / estreptomicina (100x, Thermo Fisher Scientific, Cat. Nro. 15140122)
- Suero humano tipo AB (Sigma, Cat. Nro. H3667–100ML)
- IL–4 humana recombinante (Peprotech, Cat. Nro. 200–04)
- GM–CSF humano recombinante (Peprotech, Cat. Nro. 300–03)
- TNF–α humano recombinante (Peprotech, Cat. Nro. 300–01A)
- IL–7 humana (Peprotech, Cat. Nro. 200–07)
- IL–15 humana (Peprotech, Cat. Nro. 200–15)
- IL–21 humana (Peprotech, Cat. Nro. 200–21)
- Péptidos (New England Peptide – 95% de pureza, disuelto en DMSO hasta una solución madre de 1000X a una concentración de 10 μg/μl)
- ELISpot kit para IFN–y humano (R&D Systems, Cat. Nro. EL285)

7.2.3 Métodos

7.2.3.1 Generación y maduración de células dendríticas derivadas de monocitos humanos y carga de neopéptidos

[1218] Las PBMC congeladas o frescas se descongelaron y se lavaron en medio RPMI precalentado una vez, y una alícuota de células no adherentes se reservó para la secuenciación de TCR basal. Las PBMC se resuspendieron en 10 ml de medio de células dendríticas (DC) (RPMI1640, suplementado con 5% de suero humano AB y 1% de penicilina / estreptomicina) a 5 x 10^6 células por ml, para un total de 50 millones de células. Las células se transfirieron a plástico de cultivo de tejido T–75 y se incubaron a 37 °C, 5% de CO_2 durante 2–3 horas. Después de agitar suavemente, se retiraron las células no adherentes y se desecharon, y las células adherentes (enriquecidas con monocitos) se lavaron tres veces con medio DC precalentado. Se añadieron 10 ml de medio DC suplementado con una concentración final de 20 ng/ml de GM–CSF y 20 ng/ml de IL–4 a las células adherentes. Las células adherentes se incubaron a 37 °C, 5% de CO_2, a 100% de humedad durante 5 días. El día 6, se añadió TNF–α recombinante a una concentración final de 20 ng/ml durante otras 48 horas. El día 7, las DC se recogieron y contaron, luego se cargaron con neopéptidos (cada uno a 10 μg/1 x 10^6 células/ml) o sin control de neopéptido. El día 8, las células se recogieron como DC maduras. Las DC maduras se trataron con mitomicina C a una concentración final de 20 μg/ml durante 30 minutos a 37 °C, seguido de un lavado exhaustivo antes de la coincubación con células T para el cebado.

7.2.3.2 Comienzo del cocultivo con células T autólogas

[1219] El día 0, se descongelaron congeladas o frescas, y se lavaron en medio precalentado una vez. Las PBMC luego se resuspendieron y se mezclaron con DC en una proporción de 10:1 (10 x 10^6 : 1 x 10^6 células) en 10 ml de RPMI1640 / 5% de suero

humano AB, suplementado con IL–21 a 30 ng/ml en matraces T25. Después de 3 días de cocultivo (día 3), se agregaron 10 ml adicionales de medio fresco y se suplementó con IL–7 e IL–15 a una concentración final de 5 ng/ml. Después de 3 días adicionales de cocultivo (día 6), se agregaron 10 ml adicionales de medio fresco, suplementado con IL–7 e IL–15 a una concentración final de 5 ng/ml, y el cocultivo se movió a un matraz T–75. El día 9, se agregaron 20 ml adicionales de medio, suplementado con IL–7 e IL–15 a una concentración final de 10 ng/ml, y las células se transfirieron a un matraz T–175. Los días 11–12, se recogieron las células, se realizó el ensayo ELISpot según las instrucciones del fabricante (R&D Systems), y se realizó la secuenciación de TCR (1 x 10^6 células). Los pocillos se precargaron utilizando péptido a 10 µg/ml de concentración final por pocillo, densidad celular a 2 x 10^5 células por pocillo, siembra por duplicado, e incubación durante la noche. Las manchas de IFNγ se desarrollaron y leyeron en un lector AID ELISpot según las instrucciones del fabricante.

7.2.4 Resultados

[1220] En la Tabla 22 se proporcionan datos ejemplares de experimentos de cebado de antígenos.

Tabla 22. Datos de cebado de células T

Donante	Respuesta ELISpot	Gen	SEQ ID NO	HLA (unión predicha)
1	+++	DNAJC8	76	A*31:01 / B*40:13
1	+	TMEM123	77	A*02:01
2	+++	TMEM123	77	A*02:01
2	+	SCP2	74	B*39:06
6	+	DNAJC8	76	C*07:01 / B*27
7	+++	DNAJC8	76	C*07:02 / C*06:02
8	+++	DNAJC8	76	C*07:01
8	+	SMC5	75	C*07:01 / B*08:02
8	+++	SCP2	74	C*03:03

[1221] Los lotes de PBMC derivadas de donantes se diferenciaron en DC y se cebaron con neopéptidos como se describe en la **FIG. 15**. El análisis de los datos de ELISpot muestra que, en PBMC de donantes sanos, el cebado de células T vírgenes mediante neopéptidos presentadores de DC puede dar como resultado la expansión y

maduración específicas de antígeno de poblaciones de células T efectoras (CD8). Estas poblaciones de células T exhiben reactivación específica de antígeno, como lo demuestra la secreción de IFNγ solo en presencia del péptido antigénico y no en presencia de péptidos no cebadores. Los datos también sugieren que la respuesta a los neopéptidos no se puede predecir necesariamente en función del HLA.

EJEMPLO 8

8.1 Identificación de neopéptidos

8.1.1 Descripción general

[1222] Para identificar los neopéptidos resultantes de la modulación de empalme, los péptidos de 8 a 11 aminoácidos de longitud y que se predice que se unirán al MHC de clase I a partir del proteoma canónico y modulado por empalme se emparejaron por separado con los espectros de masas en tándem utilizando un enfoque estándar de objetivo–señuelo. Primero, los transcriptos de ARNm empalmados alternativamente se tradujeron y compararon con un proteoma de referencia. A continuación, se buscaron espectros que no coincidieran con el proteoma de referencia para nuevos péptidos coincidentes. Para un diagrama esquemático de un proceso ejemplar para identificar nuevos péptidos resultantes de la modulación de empalme, véase la **FIG. 14**.

8.1.2 Métodos

8.1.2.1 Creación de una base de datos de posibles neopéptidos

[1223] Para generar una base de datos de posibles neopéptidos, se identificaron péptidos que abarcaran la unión o que contuvieran intrones que no se encuentran en un proteoma de referencia (véase Li *et al.* (2011) Mol. Cell Proteomics 10(5):M110.006536). Los péptidos derivados del proteoma de referencia se seleccionaron a partir de secuencias de proteínas revisadas manualmente y se descargaron. Además, las proteínas se filtraron para las uniones que se encuentran en tejidos normales. Como un enfoque alternativo, las proteínas completas pueden traducirse a partir de eventos de empalme, buscar péptidos que abarquen la unión o que contengan intrones, y luego hacerlos coincidir con BLAST contra el proteoma de referencia.

[1224] Para evitar pruebas estadísticas innecesarias, solo se utilizaron los péptidos predichos con probabilidad de unirse al MHC. Las secuencias de proteínas (tanto del proteoma de referencia como de la traducción predicha de transcriptos con omisión de exón o retención de intrón) se evaluaron para determinar la unión de alta afinidad a alelos MHC1 utilizando el software NetMHCPan y/o MHCnuggets. Para ambos paquetes de software, se seleccionaron aciertos con unión fuerte o débil (i) por la fuerza de predicción de unión de afinidad sin procesar (umbral de 500 nM para una unión débil), o (ii) seleccionando un gran número de péptidos reales aleatorios e identificando la

distribución de fuerzas de unión predichas para los péptidos. La fuerza de unión predicha para cualquier péptido nuevo se comparó con esta distribución. Los umbrales para la unión fuerte y débil medidos por el último método (método (ii)) fueron fuerzas de unión predichas dentro del 0.5% superior o el 2.0% superior de los péptidos reales aleatorios, respectivamente (véase Nielsen y Andreatta (2016) Genome Med. 8(1):33). Actualmente, la predicción de MHC se restringe a secuencias peptídicas de 8 a 11 aminoácidos de longitud y contenidas en la Base de Datos de Epítopos Inmunes (IEDB).

8.1.2.2 Identificación de transcriptos derivados de modulación de empalme mediante RNAseq y RiboSeq

[1225] Varios neopéptidos se derivan de dominios peptídicos más grandes (por ejemplo, TUBA1C), mientras que los fragmentos peptídicos del resto de la región traducida pueden correr el riesgo de no ser detectados. Esto puede ser una consecuencia de la degradación mejorada de las regiones no detectadas, la afinidad de unión al MHC1 o los desafíos técnicos asociados con la detección por espectrometría de masas (MS). En general, el análisis RNAseq sobrestimará el número de neopéptidos predichos (ya que no se traducirán todos los transcriptos empalmados alternativamente), mientras que el ligandoma MHC1 subestimará el número de neopéptidos predichos.

[1226] Para establecer una lista de neopéptidos, se identificaron las uniones de empalme de variantes derivadas de modulación de empalme disponibles con ribosomas unidos, como un marcador de traducción a proteínas (Andreev *et al*. (2017) Nucleic Acids Res. 45(2):513–26). RiboSeq o el perfilado ribosomal permitieron la detección de secuencias de ARNm (y dominios variantes) que estaban experimentando una traducción activa, como lo demuestra la presencia de ribosomas unidos al transcripto, así como dominios de unión de exón específicos.

EJEMPLO 9

9.1 Análisis *in vitro* de ADC anti–HER2 ejemplares

9.1.1 Métodos

[1227] Las células HCC1954, NCI–N87 o MCF7 (ATCC) se colocaron en placas en RPMI libre de rojo fenol + 10% FBS (ATCC) o EMEM + 10% FBS + insulina (0.01 mg/ml) (para MCF7) a 2.5 x 10^3 células por pocillo a 90 µL por pocillo. Las células (n=3 pocillos por condición) se trataron con conjugados en una dilución de 3 veces de respuesta a la dosis. Luego de 24 horas, las células se lisaron con 50 µL de tampón CL (IgePal CA–630, 5M NaCl, 1M Tris HCl 1M pH 7.4 en agua) que contenía 25 µL/ml de RNAsin (Promega) y se incubaron durante 45 minutos a rt en una agitadora. La mezcla resultante (1 µL) se usó para evaluar la modulación de empalme en una reacción PCR de transcripción inversa Taqman Fast Virus 1–Step MasterMix (Applied Biosystems) con los siguientes cebadores

Taqman de acuerdo con las recomendaciones del fabricante: SLC25A19 (Invitrogen, Hs00222265_m1); FBXW5 (IDT, cebador directo: CACACCAGATCGGCATCAA (SEQ ID NO:37), cebador inverso: CGATGATGTGTCCGTGTATGT (SEQ ID NO:38), sonda: ATCCTGCCACACCAGATGACCAC (SEQ ID NO:39), tintura: FAM, extintor: ZEN/Iowa Black FQ); TAOK1 (IDT, cebador directo: CTGCTTCGGATTTACTAGAAGAGATA (SEQ ID NO:40), cebador inverso: GCGTTCCCACAAAGGAATTG (SEQ ID NO:41), sonda: TGCTGACTTTGGCTCTGCTTCCAT (SEQ ID NO:42), tintura: FAM, extintor: ZEN/Iowa Black FQ); RPLP0 (Invitrogen, Hs99999902_m1).

9.2 Eficacia *in vivo* y farmacodinámica (PD) de ADC anti–HER2 ejemplares

9.2.1 Métodos – Eficacia *in vivo* en modelo de xenoinjerto NCI–N87

[1228] Los ratones CB17–SCID (Charles River Laboratories) se mantuvieron de acuerdo con las políticas de acreditación federales, estatales, municipales y de AAALAC sobre investigación animal en la ciudad de Cambridge, Massachusetts. La línea celular de carcinoma gástrico humano NCI–N87 se adquirió de la *American Type Culture Collection* (ATCC Nro. CRL–5822). Se usaron 14 células de pasaje para los experimentos en tumores. Las células se evaluaron en último lugar en cuanto a patógenos murinos el septiembre de 2016 y en cuanto a micoplasma en diciembre de 2018.

[1229] Una suspensión celular única de 5 millones de células por 0.1 ml (50% ATCC–modificación–RPMI–1640–medio, Cat. Nro. A10491–01 (Thermo–Fisher Scientific); y 50% Corning Matrigel, Cat. Nro. 356254 (VWR Scientific)) se inyectó por vía subcutánea en el flanco lateral derecho con una jeringa de calibre 25Ga. Los ratones fueron randomizados el día 0 a un volumen tumoral medio de 180–183 mm^3, n=8 por grupo para la eficacia y n=4 por grupo para la farmacodinámica (PD). El día 1, se administraron los artículos de ensayo (10 mg/kg) a un volumen de 5 ml/kg por vía intravenosa cada 7 días por 2 ciclos para la eficacia; se usó un único régimen de tratamiento para la evaluación de PD. Los animales de las cohortes de PD fueron eutanizados a las 24, 48, 72 y/o 96 horas luego de la administración de una dosis única, dependiendo del artículo de ensayo. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron una o dos veces por semana hasta la finalización del estudio (día 61). El volumen tumoral se calculó usando la fórmula longitud x $ancho^2/2$. Durante el estudio, los ratones que alcanzaron el criterio de valoración (un tamaño del tumor ≥ 20 mm^3 en cualquier dirección o un volumen tumoral ≥ peso corporal inicial x 100), o tuvieron ulceración del tumor o infección ocular fueron retirados.

[1230] Los compuestos se formularon en gabinetes de seguridad biológica. El vehículo del artículo de ensayo fue solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4 (Cat. Nro. A10010–049 (Thermo–Fisher Scientific)). Los grupos se presentan en la Tabla 23.

[1231] La actividad antitumoral se calculó de la siguiente manera:

% T/C fórmula = tratados/control*100

%TGI fórmula = (promedio vehículo$_{día\ X}$ – promedio tratados$_{día\ X}$)/ promedio vehículo$_{día\ X}$ * 100, en donde día X es día 22.

9.2.2 Métodos – PD *in vivo* (RT–qPCR)

[1232] El ARN se purificó a partir de muestras de tumores utilizando MagMAX–96 para el kit de Microarrays y el procesador de partículas magnéticas MagMAX Express–96 Deep Well (ThermoFisher Scientific). Las muestras tumorales (de tamaño 50–100 mg) se recogieron en tampón RNAlater y se mantuvieron a –80 °C hasta el aislamiento del ARN. La homogeneización del tejido se realizó mediante la adición de 2 a 3 perlas de cerámica y 1 ml de reactivo Tri en un tubo que contenía tumores, seguido de la interrupción en un instrumento Omni Bead Ruptor 24 (Omni International). El aislamiento del ARN se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[1233] Los lisados de ARN se aislaron y se transcribieron de manera inversa utilizando el TaqMan Fast Virus 1–Step Master Mixt (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[1234] La PCR cuantitativa a partir de ADNc se realizó utilizando la mezcla maestra de expresión génica TaqMan (ThermoFisher Scientific) con sondas de transcripto dirigidas a las uniones FBXW5 o TAOK1 duplicadas con ARN VIC–PL de *RPLP0* (ThermoFisher Scientific) y se cuantificó utilizando el método *ΔΔCt*.

Tabla 23. Grupos

Artículos de ensayo (eficacia)	Artículos de ensayo (PD)
Vehículo (PBS)	Vehículo (PBS)
TDM1	TDM1
trastuzumab (AB185)	trastuzumab (AB185)
AB185–ADL5–D2	AB185–ADL5–D2
AB185–ADL1–D4	AB185–ADL1–D4
AB185–ADL5–D15	AB185–ADL5–D15
AB185–ADL14–D1	AB185–ADL14–D1

9.3 Resultados

Análisis *in vitro*:

[1235] Se midieron ADC anti–HER2 ejemplares para determinar la actividad antiproliferativa en dos líneas celulares HER2 positivas de diferente linaje (cáncer de mama HCC1954 y cáncer gástrico N87) y una línea celular HER2 negativa (MCF7). Se midió la eficiencia de la inhibición del crecimiento (potencia GI50), así como la profundidad de respuesta (R min en comparación con el control). Se midió el empalme alternativo en un gen de mantenimiento representativo SLC25A19 mediante qPCR después del tratamiento

de los ADC en las líneas celulares especificadas. Se midieron GI50 y la profundidad de la respuesta de empalme. Los resultados del análisis *in vitro* se muestran en la Tabla 25.

[1236] En general, los ADC anti–HER2 probados mostraron una potencia favorable en las líneas celulares positivas para el antígeno y una respuesta mínima para la viabilidad y el empalme en la línea celular negativa para el antígeno. Los ADC difirieron en la profundidad de la respuesta en la destrucción celular y en la integridad del empalme de unión alternativa de SLC25A19. Los ADC se clasificaron en una de las cuatro categorías en cada una de las líneas celulares positivas para el antígeno: 1) alta profundidad de respuesta / letalidad y alta respuesta de empalme; 2) alta profundidad de respuesta / letalidad y baja respuesta de empalme; 3) baja profundidad de respuesta / letalidad y alta respuesta de empalme; o 4) baja letalidad celular y baja respuesta de empalme. Varios ADC mostraron un comportamiento favorable de categoría 3 en la línea celular de cáncer gástrico N87. AB185–ADL13–D4 fue consistentemente letal y mostró una gran profundidad de respuesta de empalme tanto en las células HCC1954 como en las células N87. Esta letalidad específica del antígeno consistente es generalmente deseable para los ADC y el enlazador soluble en agua permitiría una carga aún mayor del fármaco con buenas especificaciones de conjugado. El cambio del enlazador a ADL23 (tripéptido EVC) cambió sorprendentemente el perfil en ambas líneas celulares. AB185–ADL1–D12 también fue único porque es altamente letal en HCC1954, pero la potencia celular de la carga útil es consistentemente baja en varias líneas de tumores sólidos y hemo. D12 también es la única carga útil en esta serie con un bajo índice de flujo de salida. Por lo tanto, los ADC que liberan esta carga útil pueden ser activos contra múltiples cánceres resistentes a los medicamentos que expresan un antígeno objetivo.

[1237] Cuando la potencia de empalme (IC50 qPCR) se compara con la potencia celular (GI50 CTG) en las células de cáncer de mama HCC1954, el enlazador glucurónido y la carga útil D12 mostraron propiedades favorables. La carga útil de cambio de carbamato C6/C7 (D8) y la carga útil dibásica (D5) mostraron potencia celular, pero no demostraron el empalme alternativo más eficiente. El cambio de un dipéptido a un enlazador tripeptídico con la carga útil D4 o D1 redujo la eficiencia de empalme alternativo, pero la actividad celular se mantuvo alta. Véase la **FIG. 18** (tamaño por letalidad celular, sombreado por profundidad de la respuesta de empalme alternativo).

[1238] Cuando la potencia de empalme (IC50 qPCR) se compara con la potencia celular (GI50 CTG) en células de cáncer gástrico N87, el enlazador glucurónido (con D4) y la carga útil D12 mostraron propiedades favorables, como en HCC1954. En general, todos los ADC mostraron un empalme y una potencia mínimos en la línea celular MCF7 negativa para HER2. A pesar de la potencia celular relativamente baja de la carga útil D12, la

actividad de los ADC anti–HER2 con esta carga útil fue alta y la carga útil mostró un bajo índice de flujo de salida. Estas propiedades podrían traducirse en una mejor eficacia en un entorno de cáncer resistente a múltiples fármacos. Véase la **FIG. 19** (tamaño por letalidad celular, sombreado por profundidad de la respuesta de empalme alternativo).

[1239] El análisis *in vitro* se realizó en ADC anti–HER2 adicionales. En la Tabla 26 se muestra una comparación entre los ADC anti–HER2 y las cargas útiles correspondientes. Cuando se compara la potencia y letalidad de los ADC anti–HER2 con la estabilidad y la permeabilidad de las cargas útiles correspondientes (**FIG. 20**), AB185–ADL5–D15 demostró un balance favorable de potencia, letalidad, estabilidad química y permeabilidad del catabolito (por ejemplo, para la destrucción adicional putativa). Como se describe a continuación, AB185–ADL5–D15 también fue activo *in vivo* y demostró una potente actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto NCI–N87.

Eficacia *in vivo*:

[1240] La línea celular de cáncer gástrico NCI–N87 que expresa HER2 humano y su modelo de xenoinjerto se generaron inoculando células NCI–N87 en ratones SCID para evaluar la actividad antitumoral de ADC anti–HER2 ejemplares. Trastuzumab y TDM1 se utilizaron como comparadores.

[1241] Los efectos antitumorales de trastuzumab intravenoso, TDM1 y cuatro ADC HER2 en el modelo de xenoinjerto NCI–N87 de carcinoma gástrico se muestran en la **FIG. 21** y la **FIG. 23**. Los efectos del peso corporal se muestran en la **FIG. 22** y la **FIG. 23**. El artículo de ensayo o el vehículo se administraron por vía intravenosa (IV) Q7D durante 2 ciclos. Los datos representan la media ± SEM (volumen del tumor, mm^3) o ± SEM (peso corporal, %) (N = 8). * p <0.0001 en comparación con el grupo del vehículo el día 22 con una prueba ANOVA de una vía.

[1242] Los datos tabulares para la eficacia *in vitro* e *in vivo* en NCI–N87 se proporcionan en la Tabla 24. Los datos tabulares representan el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento tumoral (TGI del volumen tumoral) o % T/C (volumen tumoral) (N = 8). AB185–ADL5–D2 fue sorprendentemente activo *in vivo* a pesar de la poca letalidad *in vitro*, y demostró una eficacia i*n vivo* mejorada en comparación, por ejemplo, con AB185–ADL14–D1.

Tabla 24. Eficacia de ADC anti–HER2 ejemplares en NCI–N87

	Día 22 (*in vivo*)		NCI–N87 (*in vitro*)		
	TGI (%)	T/C (%)	$GI_{50\ (nM)}$	$LD_{50\ (nM)}$	R_{min}%
Vehículo/ IV/ Q7Dx2	–	–	–	–	–
TDM1/ 10 mg/kg/ IV/ Q7Dx2	71	29	0.1	40	–37
trastuzumab/ 10 mg/kg/ IV/ Q7Dx2	4	96	>200	>200	98
AB185–ADL5–D2/ 10 mg/kg/ IV/ Q7Dx2	73	27	0.2	>200	0
AB185–ADL1–D4/ 10 mg/kg/ IV/ Q7Dx2	68	32	0.1	>200	–22
AB185–ADL5–D15/ 10 mg/kg/ IV/ Q7Dx2	67	33	0.1	>200	–37
AB185–ADL14–D1/ 10 mg/kg/ IV/ Q7Dx2	–7	107	0.1	>200	–40

[1243] Trastuzumab, un anticuerpo anti–HER2 humano y una terapia estándar para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo, no demostró actividad antitumoral en este modelo. Sin embargo, TDM1, un tratamiento de segunda línea que contiene trastuzumab más DM1 ligado covalentemente (un agente citotóxico) mostró una actividad antitumoral significativamente mejor (TGI 71%) que el trastuzumab solo (TGI 4%). Entre los cuatro ADC analizados, ABL185–ADL5–D2, AB185–ADL5–D15 y AB185–ADL1–D4 mostraron una potente actividad antitumoral con inhibición del crecimiento tumoral (TGI) del 73%, 67% y 68%, respectivamente. Los tumores de todos los grupos que respondieron finalmente comenzaron a crecer nuevamente. No se observó respuesta completa en ningún grupo, y uno de ocho animales en cada uno de los siguientes grupos mostró una respuesta parcial: TDM1, ABL185–ADL5–D2 y AB185–ADL5–D15. Todos los reactivos y artículos de ensayo fueron bien tolerados por los ratones y se observó una pérdida de peso corporal mínima. En general, 3 de los 4 ADC anti–HER2 probados demostraron una actividad antitumoral igualmente potente en comparación con TDM1 en el modelo de tumor NCI–N87 sin una pérdida significativa de peso corporal.

PD *in vivo*:

[1244] La modulación PD de las uniones de ARNm por trastuzumab intravenoso, TDM1 y cuatro ADC anti–HER2 en el modelo de xenoinjerto NCI–N87 de carcinoma gástrico se muestra en las **FIGS. 24A–24D**. Se monitoreó la RT–qPCR de FBXW5 (transcripto de ARNm maduro) y TAOK1 (transcripto de neounión). El artículo de ensayo o el vehículo se administró por vía intravenosa (IV) a 10 mg/kg. Los animales (N = 4 por grupo) se recogieron a las 48 horas (**FIG. 24A** y **FIG. 24B**) o en los momentos indicados (**FIG. 24C** y **FIG. 24D**). Los tumores fueron aislados para la extracción de ARN y RT–qPCR. *

p <0.05 frente al vehículo utilizando ANOVA de una vía (**FIG. 24A** y **FIG. 24B**) o ANOVA de dos vías (**FIG. 24C** y **FIG. 24D**).

[1245] Ni trastuzumab ni TDM1 mostraron cambios significativos en el empalme observado de FBXW5 o TAOK1. Los conjugados AB185 ADL5–D2 / ADL1–D4 / ADL5–D15 mostraron un agotamiento significativo de FBXW5, y los conjugados AB185 ADL5–D2 / ADL1–D4 mostraron incrementos significativos en TAOK1. ADL5–D15 mostró un aumento en TAOK1, pero no alcanzó significación estadística. ADL14–D1 no mostró cambios estadísticamente significativos en la abundancia de cualquiera de los transcriptos de ARNm.

Tabla 25. Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares y cargas útiles correspondiente

							Propiedades - HER2 ADCs								
							actividad antiproliferativa célula 1 antigeno (+)			actividad antiproliferativa célula 2 antígeno (+)			actividad antiproliferativa célula antígeno (-)		
ID lote ADC	Enlazador	Categoría letalidad/ empalme (HCC1954 ,N87)	DAR	% monómero	Fármaco libre	Conc.	CTGlo Media g GI50 (nM) HER2 SMLA detección HCC1954.1	CTGlo Media g LD50 (nM) HER2 SMLA detección HCC1954.1	CTGlo media MinResp% HER2 SMLA detección HCC1954.1	CTGlo Media g GI50 (nM) HER2 SMLA detección NCIN87	CTGlo Media g LD50 (nM) HER2 SMLA detección NCIN87	CTGlo media MinResp% HER2 SMLA detección NCIN87	CTGlo Media g GI50 (nM) HER2 SMLA detección MCF7	CTGlo Media g LD50 (nM) HER2 SMLA detección MCF7	CTGlo media MinResp% HER2 SMLA detección MCF7
AB185-ADL1-D12	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.25	99%	<1%	0.82	0.032	0.09	-78.471	<0.015	>100.000	-35.162	>100.000	>100.000	53.606
AB185-ADL13-D4	b-glucuronida	1,1	4.47	99%	<1%	0.78	0.059	0.275	-80.145	0.029	3.436	-55.322	>100.000	>100.000	87.451
AB185-ADL1-D5	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.14	99%	<1%	1.1	0.079	0.298	-81.189	0.04	>100.000	-32.663	>100.000	>100.000	93.099
AB185-ADL23-D4	mc-Glu-Val-Cit-PABC	2,3	5.84	99%	<1%	1.03	0.175	1.526	-68.762	0.049	>100.000	-49.316	>100.000	>100.000	91.248
AB185-ADL1-D3	mc-Val-Cit-PABC	2,3	6.75	99%	<1%	1.13	0.117	0.741	-77.982	0.049	>100.000	-15.629	>100.000	>100.000	91.495
AB185-ADL22-D4	mal-PEG2-Val-Cit-PABC	1,3	6.12	99%	<1%	1.01	0.134	0.797	-75.134	0.057	>100.000	-25.808	>100.000	>100.000	79.996
AB185-ADL21-D1	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	2,3	5.51	99%	<1%	1.35	0.207	2.65	-72.894	0.072	>100.000	-46.965	>100.000	>100.000	74.018
AB185-ADL21-D8	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	4,3	6.4	99%	<1%	1.67	0.493	>100.000	-37.547	0.138	>100.000	-40.873	>100.000	>100.000	94.772
AB185-ADL21-D4	mc-Ala-Ala-Asn-PABC		1.55	99%	<1%	1.11	1.174	>100.000	14.652	0.235	>100.000	-36.848	>100.000	>100.000	96.18
AB185-ADL15-D2	mal-CH2CH2-O-CH2CH2- (no escindible)	3,ND	3.25	98.80%	<1%	1.6	0.24	>200.000	-13.023	0.115	>100.000	-15.056			

							Propiedades - HER2 ADCs					
							PD empalme célula 1 antigeno (+)		PD empalme célula 2 antigeno (+)		PD empalme célula antígeno (-)	
ID lote ADC	Enlazador	Categoría letalidad/ empalme (HCC1954 ,N87)	DAR	% monómero	Fármaco libre	Conc.	qPCR-CellScreen Media g IC50 (nM) HER2 SMLA detección SLC25A19 HCC1954.1 nulo	qPCR-CellScreen Media MinResp% HER2 SMLA detección SLC25A19 HCC1954.1 nulo	qPCR-CellScreen Media g IC50 (nM) HER2 SMLA detección SLC25A19 NCIN87 nulo	qPCR-CellScreen Media MinResp% HER2 SMLA detección SLC25A19 NCIN87 nulo	qPCR-CellScreen Media g IC50 (nM) HER2 SMLA detección SLC25A19 MCF7 nulo	qPCR-CellScreen Media MinResp% HER2 SMLA detección SLC25A19 MCF7 nulo
AB185-ADL1-D12	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.25	99%	<1%	0.82	0.144	-85.744	0.095	-93.185	>100.000	-12.254
AB185-ADL13-D4	b-glucuronida	1,1	4.47	99%	<1%	0.78	0.45	-72.455	0.177	-93.984	>100.000	-28.389
AB185-ADL1-D5	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.14	99%	<1%	1.1	0.624	-65.799	0.095	-91.243	>100.000	-10.455
AB185-ADL23-D4	mc-Glu-Val-Cit-PABC	2,3	5.84	99%	<1%	1.03	>100.000	-40.549	0.249	-89.841	>100.000	-16.033
AB185-ADL1-D3	mc-Val-Cit-PABC	2,3	6.75	99%	<1%	1.13	>100.000	-38.621	0.199	-78.218	>100.000	-24.342
AB185-ADL22-D4	mal-PEG2-Val-Cit-PABC	1,3	6.12	99%	<1%	1.01	2.302	-58.063	0.17	-91.266	>100.000	-23.433
AB185-ADL21-D1	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	2,3	5.51	99%	<1%	1.35	>100.000	-37.396	0.201	-84.588	>100.000	-15.463
AB185-ADL21-D8	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	4,3	6.4	99%	<1%	1.67	>100.000	-27.319	0.577	-70.144	>100.000	-12.798
AB185-ADL21-D4	mc-Ala-Ala-Asn-PABC		1.55	99%	<1%	1.11	>100.000	-16.088	5.097	-54.535	>100.000	-12.096
AB185-ADL15-D2	mal-CH2CH2-O-CH2CH2-` (no escindible)	3,ND	3.25	98.80%	<1%	1.6			0.296	-83.148		

Tabla 25 (continuación). Caracterización de ADC anti–HER2 ejemplares y cargas útiles correspondientes

							Propiedades - Cargas útiles libres correspondientes												
							unión blanco	ensayo empalme bioquímico			potencia cel. línea cel #1		potencia cel. línea cel. #2		potencia cel. línea cel. #3		permeabilidad celular		
ID lote ADC	Enlazador	Categoría letalidad/ empalme (HCC1954 ,N87)	DAR	% monómero	Fármaco libre	Conc.	SPA-ATS Media gIC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS Media gIC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS Media gIC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	Ratio Ad2.1/2.2	CTGlo-ATS Media gGI50 (nM) 72h NCIH1650.1	CTGlo-ATS Media g LD50 (nM) 72h NCIH1650.1	CTGlo-ATS Media g GI50 (nM) 72h NCIH1568.1	CTGlo-ATS Media g LD50 (nM) 72h NCIH1568.1	CTGlo-ATS Media g GI50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS Media g LD50 (nM) 72h THP1.1	Perm. Mean Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s)	Perm. Mean Caco-2 B-A Perm (10e-6 cm/s)	ER
AB185-ADL1-D12	mc-Val-Ct-PABC	1,3	6.25	99%	<1%	0.82		16.528	25.09	0.659	257.925	>10000.00	163.604	1193.087	202.487	900.227	0.17	0.23	1.353
AB185-ADL13-D4	b-glucuronida	1,1	4.47	99%	<1%	0.78	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL1-D5	mc-Val-Ct-PABC	1,3	6.14	99%	<1%	1.1		17.392	23.943	0.726									
AB185-ADL23-D4	mc-Glu-Val-Ct-PABC	2,3	5.84	99%	<1%	1.03	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL1-D3	mc-Val-Ct-PABC	2,3	6.75	99%	<1%	1.13		9.326	10.928	0.853									
AB185-ADL22-D4	mal-PEG2-Val-Ct PABC	1,3	6.12	99%	<1%	1.01	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL21-D1	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	2,3	5.51	99%	<1%	1.35	6.085	17.568	15.853	1.108	12.121	>10000.00	7.363	65.737	11.085	41.408	0.14	2.05	14.64
AB185-ADL21-D8	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	4,3	6.4	99%	<1%	1.67	5.921	11.403	9.034	1.262	19.15	>10000.00	6.568	68.125	8.745	38.969	0.128	2.027	15.88
AB185-ADL21-D4	mc-Ala-Ala-Asn-PABC		1.55	99%	<1%	1.11	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL15-D2	mal-CH2CH2-O-CH2CH2- (no escindible)	3, ND	3.25	98.80%	<1%	1.6													

Tabla 26. ADC anti–HER2 ejemplares – Células HCC1954

					Propiedades HER2 ADCs antiproliferative activity antigen (+) cell #1	
ID lote ADC	Enlazador	DAR	Permeabilidad Caco-2 A-B (10e-6 cm/s)	pH 5.5 Estabilidad (t1/2, 37C)	CTGIo Media g GI50 (nM) HER2 SMLA detección HCC1954.1	CTGIo Media MinResp% HER2 SMLA detección HCC1954.1
AB185-ADL5-D19	QVal-Ala	6.600	16	0.8	0.278	-47.381
AB185-ADL5-D25	QVal-Ala	6.000	0.14	3.4	0.038	-46.265
AB185-ADL5-D2	QVal-Ala	4.140	0.6	4	0.206	-12.239
AB185-ADL1-04	Val-Cit	2.800	0.1	4.5	0.050	-57.212
AB185-ADL5-D10	QVal-Ala	4.020	1.8	5	0.254	-2.273
AB185-ADL1-D16	Val-Cit	4.400	0.72	7	2.086	
AB185-ADL5-D17	QVal-Ala	3.960	20	7	2.668	14.873
AB185-ADL5-D34	QVal-Ala		26	7	3.325	-38.285
AB185-ADL5-D15	QVal-Ala	4.000	3.4	7	0.912	-45.388

EJEMPLO 10

10.1 Selección de indicación / blanco impulsada por bioinformática

[1246] Para identificar los antígenos blanco altamente expresados en tumores de carga de mutación tumoral baja (TMB), en comparación con el tejido normal, se realizó un análisis predictivo de bioinformática. Este ejemplo explica 1) cómo se definió cada filtro; y 2) cómo usar la tabla antígeno / indicación para identificar los pares de blanco / tumor adecuados. Para un diagrama esquemático de un análisis de blanco / indicación ejemplar, véase la **FIG. 25**.

10.1.1 Descripción general

[1247] Los antígenos blanco y las indicaciones se identificaron mediante un análisis predictivo de bioinformática. Los datos de TCGA se procesaron para la carga de mutación tumoral (TMB), la expresión de antígenos blanco para la administración de ADC y la infiltración inmune del tumor. Los análisis, utilizando valores de corte publicados de TMB

e infiltración para estratificar a los respondedores predichos frente a los no respondedores a los inhibidores del punto de control inmune (ICI), se realizaron para identificar las indicaciones y los antígenos correspondientes. La expresión de antígeno en superficie se filtró adicionalmente para evaluar una población probabilística con expresión de antígeno al menos 2 veces más alta que cualquier tejido normal (según se evaluó en la base de datos de expresión de tejido GTEx). Las indicaciones (o subconjuntos de un linaje TCGA) con un porcentaje adecuado de pacientes que tienen uno o más antígenos blanco se analizaron además para determinar la mutación y las métricas inmunitarias. Se evaluaron los porcentajes de pacientes antígeno positivos que tienen una carga de mutación tumoral por debajo de un agregado de 10 mutaciones/megabase y con una puntuación de infiltración de células T superior a 0.5. Las indicaciones con una estimación de ~50% de los pacientes que cumplen con estos criterios se enumeran en la Tabla 27. Los pacientes de estas cohortes (pero no limitados a estas cohortes) pueden responder al tratamiento con un modulador de empalme ADC (por ejemplo, un modulador de empalme ADC descrito aquí).

10.1.2 Métodos

[1248] Predicción de la indicación para la anotación de la tabla de antígenos de los Anales de Oncología:

Antígeno: nombre del gen del antígeno, solo 59 genes con probabilidad de ser buenos objetivos de ADC a partir de la revisión de la literatura de Annals of Oncology (véase Moek *et al.* (2017) Annals of Oncology, 28: 3083–3091) se incluyeron en la tabla (análisis completo inicial incluido, todos los genes de surfaceoma *in silico*)

Cohorte: nombre de cohorte TCGA

SUBTIPO: información de subtipo de tumor TCGA

Casos_Total: El número total de casos

Casos.por.subtipo: El número de casos por subtipo

LTPM_mediana: Valor de mediana de expresión por Log2(TPM + 1)

LTPM_mediana_BajaTMB: Valor de mediana de expresión por Log2(TPM + 1) para los casos con baja TMB (< 350)

LTMB_Mediana: Valor de mediana de Log10(TMB)

LTMB_MAD: Medición robusta de desviación estándar por valor MAD de Log10(TMB)

Infil_Mediana: Valor de mediana de puntaje de infiltración según la firma de células T PLoS One

Infil_MAD: Medición robusta de desviación estándar por valor MAD de puntaje de infiltración según la firma de células T PLoS One

Cor.con.Pureza: Correlación de expresión con pureza del tumor

GTEX_Tejido: El nombre del tejido GTEx con el mayor valor de mediana de expresión

GTEX_LTPM_Mediana: La mediana del valor de expresión en el tejido GTEx con el lmayor valor de mediana de expresión

Surfaceoma.Filtro*: Población de pacientes luego de aplicar el filtro de surfaceoma: expresión > 2 veces x tejido normal GTEx con la mayor mediana

BajaTMB.Filtro: Población de pacientes luego de aplicar filtro de baja TMB: < 350 por exoma–sec (10 por mega bases2)

BajaTMB.Surfaceoma.Filtro: Población de pacientes luego de aplicar ambos filtros de surfaceoma y tmb

HiInfil.BajaTMB.Surfaceoma.Filtro: Población de pacientes luego de aplicar tres filtros: filtro de expresión de surfaceoma, filtro de baja tmb y filtro de alta infiltración

Surfaceoma.Filtro.Porc: Porcentaje de población luego de aplicar el filtro de surfaceoma: expresión > 2 veces x tejido normal GTEx con la mayor mediana

BajaTMB.Filtro.Porc: Porcentaje de población luego de aplicar el filtro de baja TMB: < 350

BajaTMB.Surfaceoma.Filtro.Porc: Porcentaje de población luego de aplicar tanto el filtro de surfaceoma como el de tmb

HiInfil.BajaTMB.Surfaceoma.Filtro.Porc: Porcentaje de población luego de aplicar tres filtros: filtro de expresión de surfaceoma, filtro de baja tmb y filtro de alta infiltración

[1249] Estimación probabilística de población de pacientes:

Recursos compilados:

1. Documento de panorama inmune Pan–can (Ready *et al.* (2019) Journal of Clinical Oncology, 37:992–1000)
2. Conjunto de datos de TCGA RNA–seq / Exoma–sec de Omicsoft
3. Firmas de genes inmunes (Thorsson *et al.* (2018) Immunity, 48, 812–830)
4. Datos GTEx v7

La carga de mutaciones tumorales se calculó a partir del llamado de mutaciones TCGA exoma–sec usando datos de Omicsoft. Se usó la firma de células T PLoS One (CD3D, CD3E, CD2) para cuantificar la infiltración inmune de las muestras. El puntaje Z se generó usando el valor log2(TPM+1) a partir de datos de TCGA RNA–seq.

Surfaceoma.Filtro: La probabilidad del paciente individual de tener un valor de expresión >2 veces (log2(TPM + 1)) en comparación con el tejido normal GTEx con la mayor mediana se calculó de la siguiente manera:

1. Identificar el tejido normal GTEx que tiene el mayor valor de mediana para

este gen entre todos los tejidos normales GTEx, suponer que es T_h

2. Sintetizar los datos de GTEx para este gen con 1000 pacientes para cada tejido usando la Técnica de Sobremuestreo de Minoridad Sintética (SMOTE (Siemers *et al.* (2017) PLoS One, 12(7):e0179726) manteniendo la distribución de datos por tejido

3. Contar el número de veces (n veces) que este paciente tendrá > 2 veces los datos sintetizados GTEx para el tejido T_h, la probabilidad de que este paciente tenga > 2 veces el GTEx normal es n / 1000

4. Calcular esta probabilidad para cada paciente

5. La suma de la probabilidad individual es la estimación probabilística de la población de la cohorte con > 2 veces más que GTEx normal

6. Cuando se aplican otros filtros juntos, la suma de la probabilidad individual será solo para los pacientes que pasan los otros filtros

10.1.3 Ejemplos

[1250] Los antígenos blanco y las indicaciones identificadas usando el análisis predictivo de bioinformática ilustrativo anterior se presentan en la Tabla 27.

Tabla 27. Antígenos blanco e indicaciones ilustrativas

Antígeno blanco	**Indicaciones**
MSLN	Cáncer de ovario Cáncer de cérvix Cáncer de páncreas Adenocarcinoma de pulmón
EPHA2	Cáncer de esófago
FOLH1	Cáncer de próstata
CDH6	Cáncer de riñón
CEACAM5	Cáncer colorrectal
CFC1B	Cáncer de páncreas
ENPP3	Cáncer de riñón
FOLR1	Cáncer de ovario
HAVCR1	Cáncer de riñón Cáncer de esófago
KIT	Cáncer de riñón
MET	Cáncer de riñón Cáncer de esófago
MUC16	Cáncer de ovario Cáncer de cérvix

	Cáncer de mama
SLC39A6	Cáncer de mama Cáncer de próstata
SLC44A4	Cáncer de próstata
STEAP1	Cáncer de próstata

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

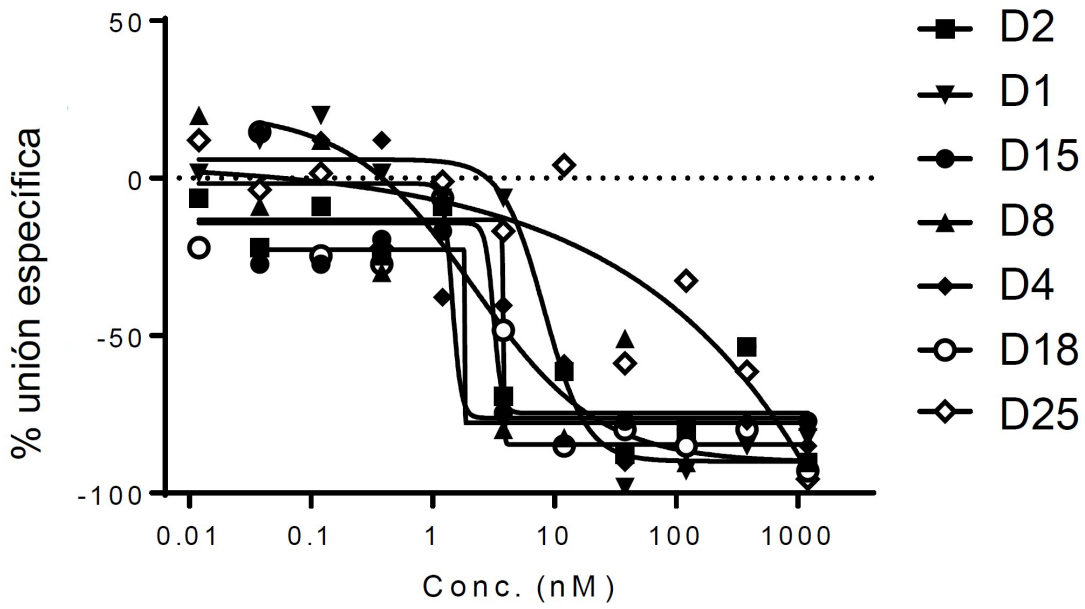

50
0
-50
-100
% unión específica
0.01
0.1
1
10
100
1000
Conc. (nM)
D2
D1
D15
D8
D4
D18
D25

FIG. 1

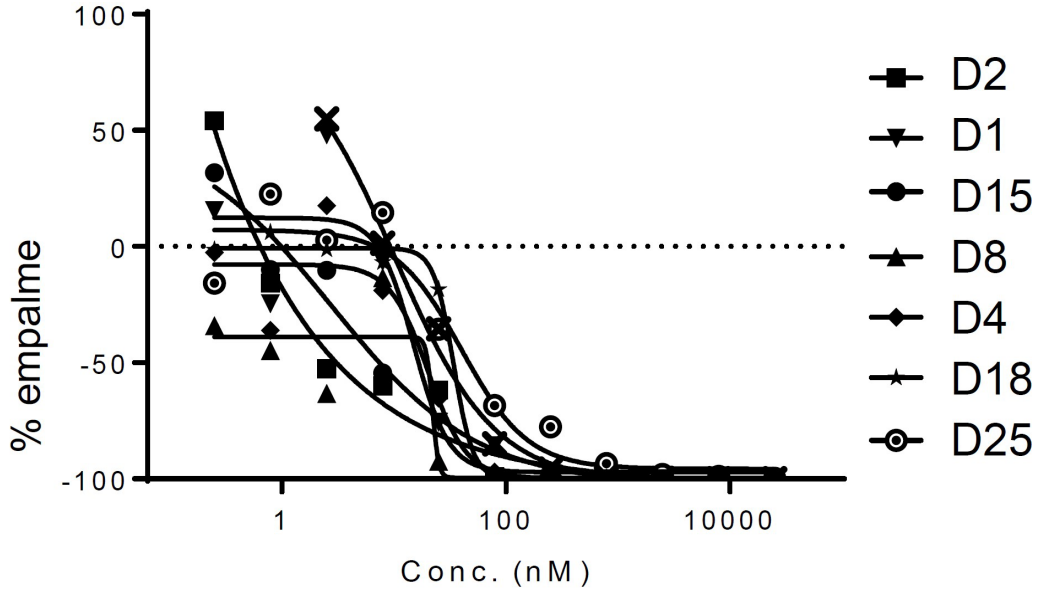

100
50
0
-50
-100
% empalme
1
100
10000
Conc. (nM)
D2
D1
D15
D8
D4
D18
D25

FIG. 2

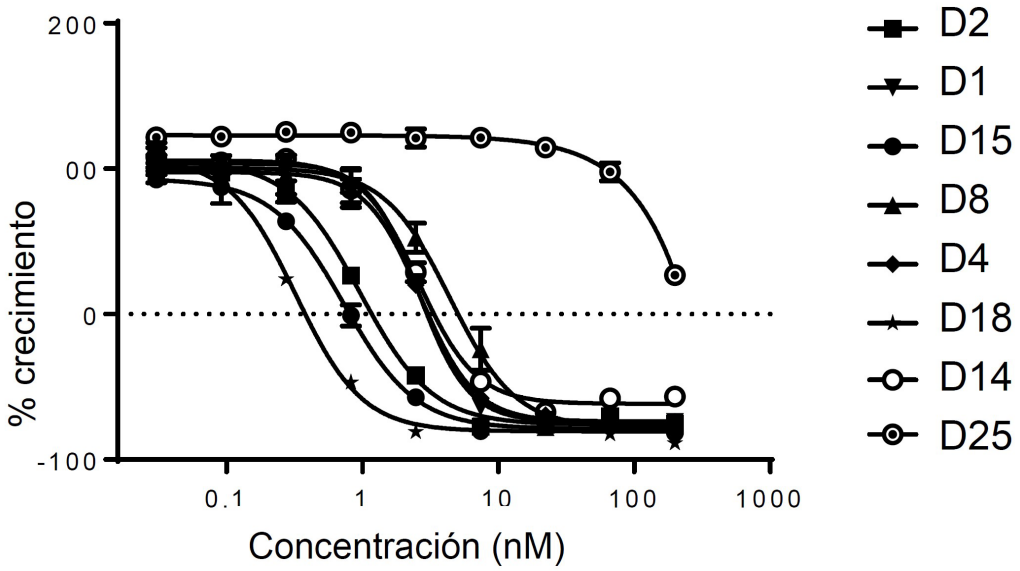

200
00
0
-100
% crecimiento
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
D2
D1
D15
D8
D4
D18
D14
D25

FIG. 3

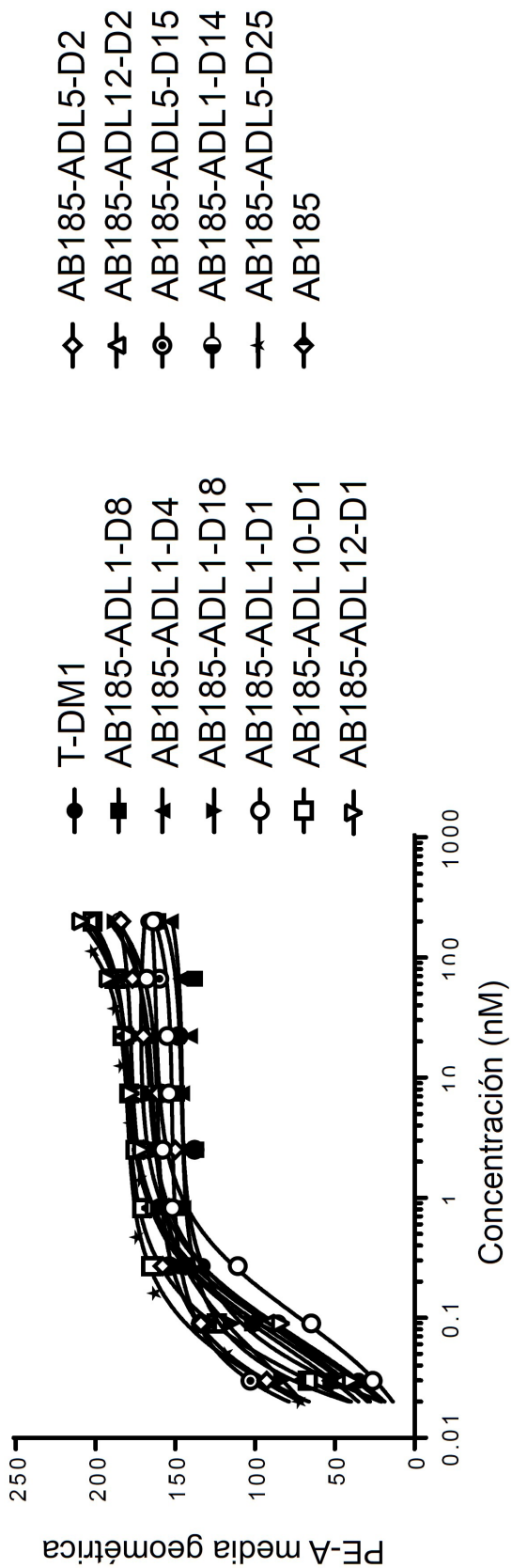

T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25
AB185
PE-A media geométrica
250
200
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)

FIG. 4

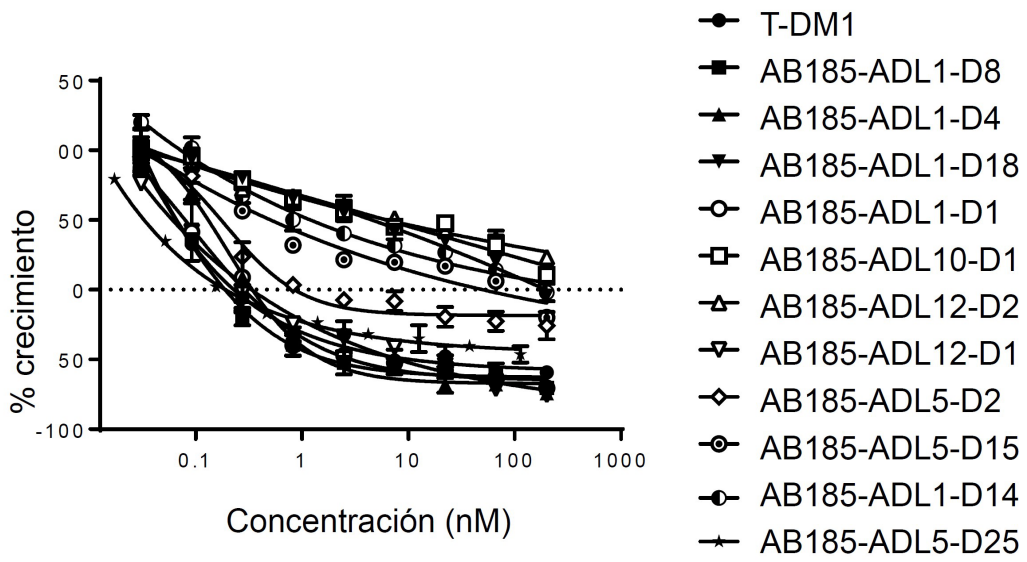

% crecimiento
50
00
50
0
50
-100
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25

FIG. 5A

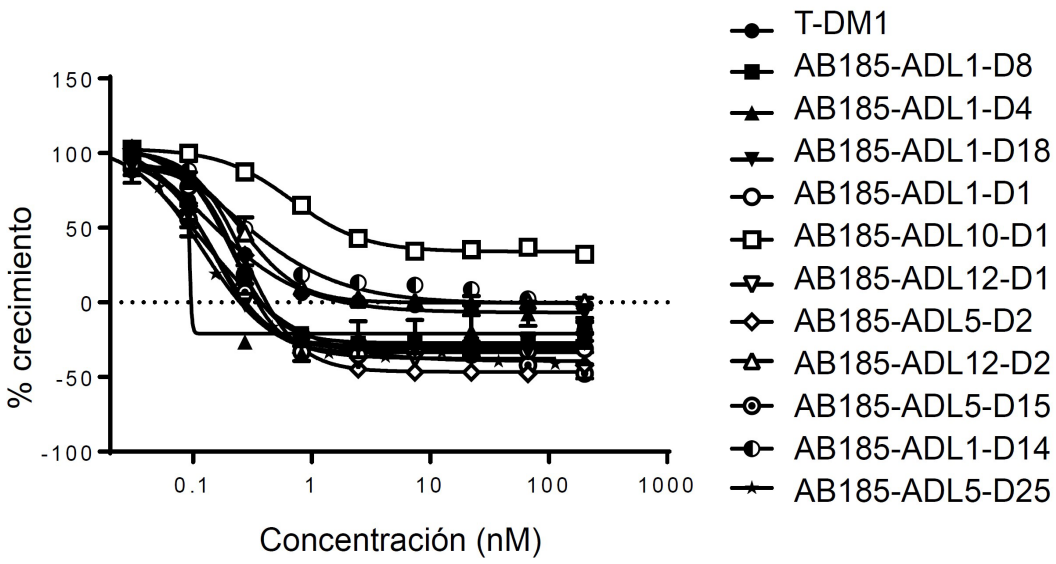

150
100
50
0
-50
-100
% crecimiento
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25

FIG. 5B

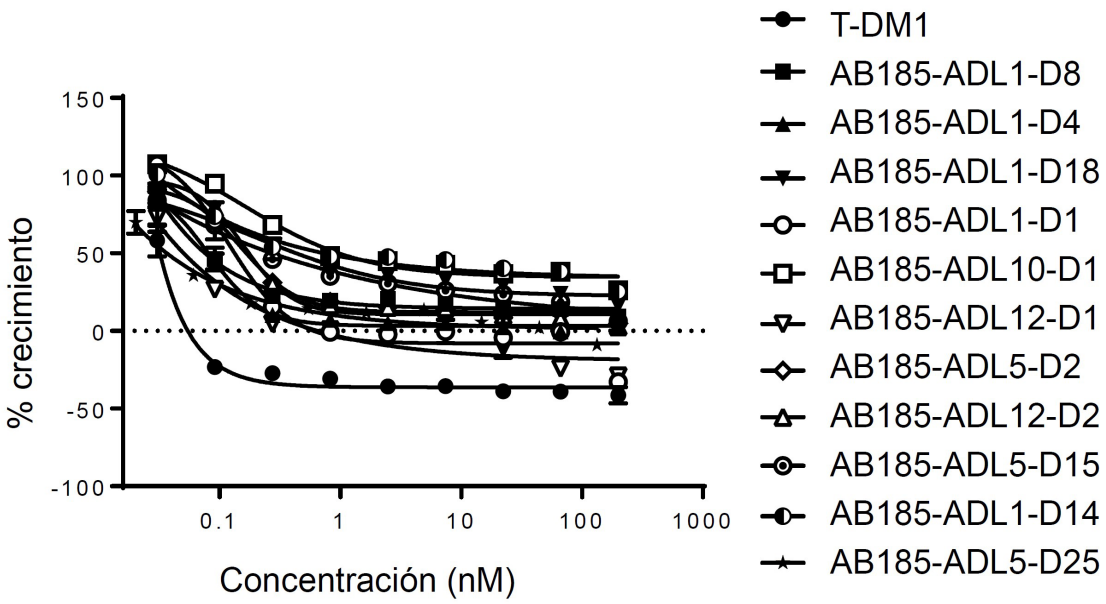

150
100
50
0
-50
-100
% crecimiento
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25

FIG. 5C

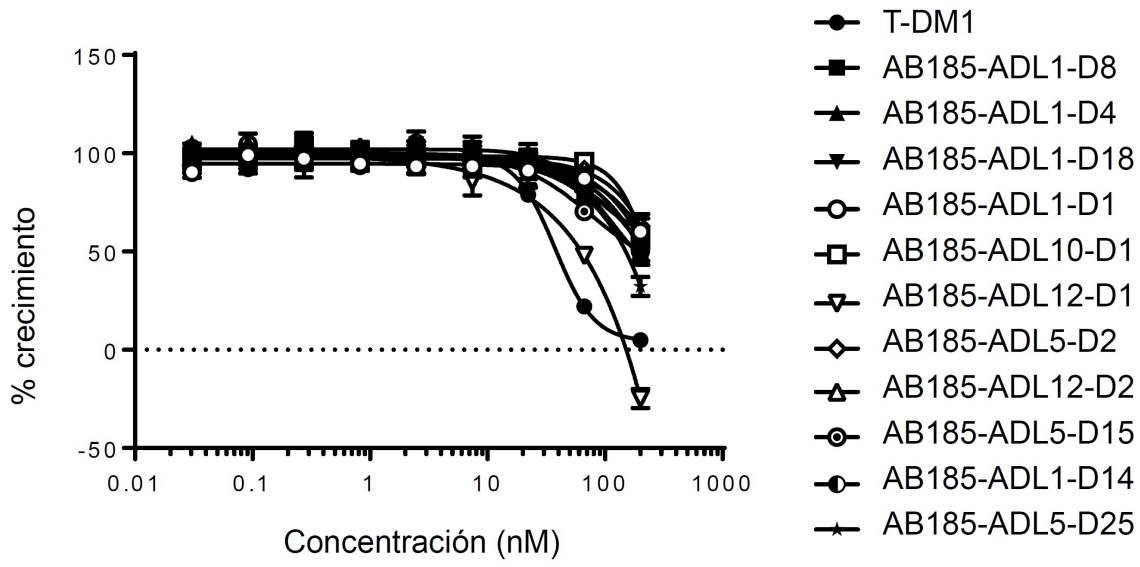

150
100
50
0
-50
% crecimiento
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25

FIG. 6

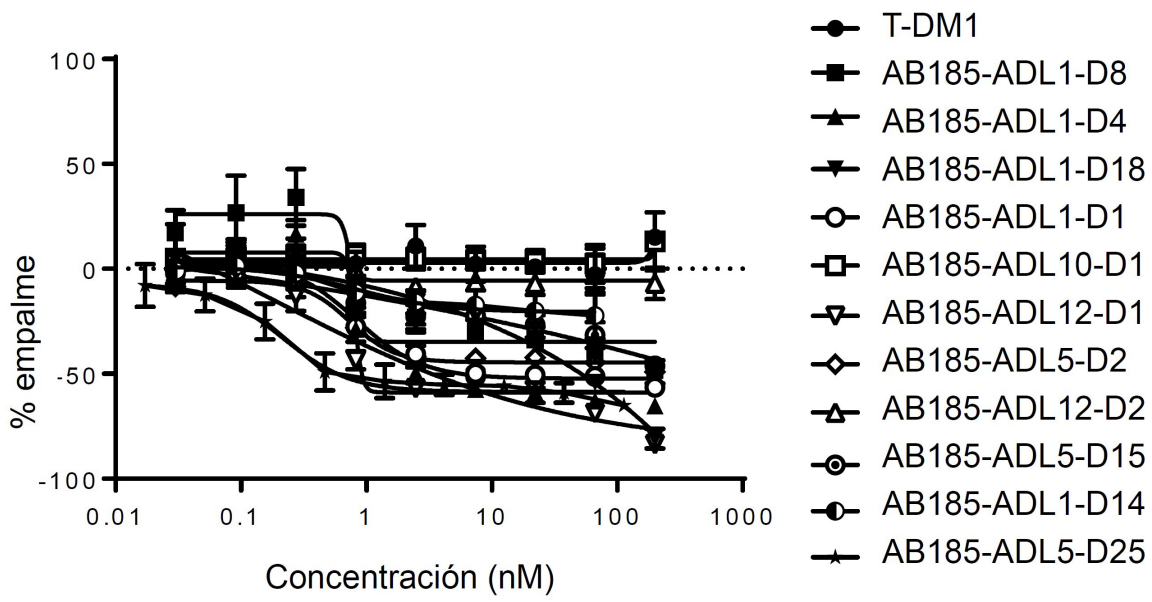

100
50
0
-50
-100
% empalme
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25

FIG. 7

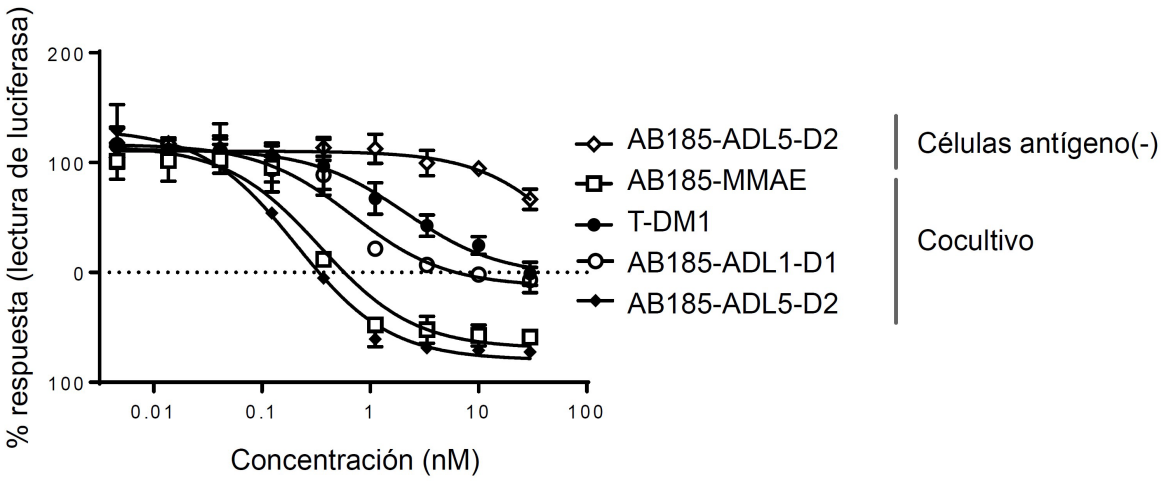

% respuesta (lectura de luciferasa)
200
100
0
100
0.01
0.1
1
10
100
Concentración (nM)
AB185-ADL5-D2
AB185-MMAE
T-DM1
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL5-D2
Células antígeno(-)
Cocultivo

FIG. 8

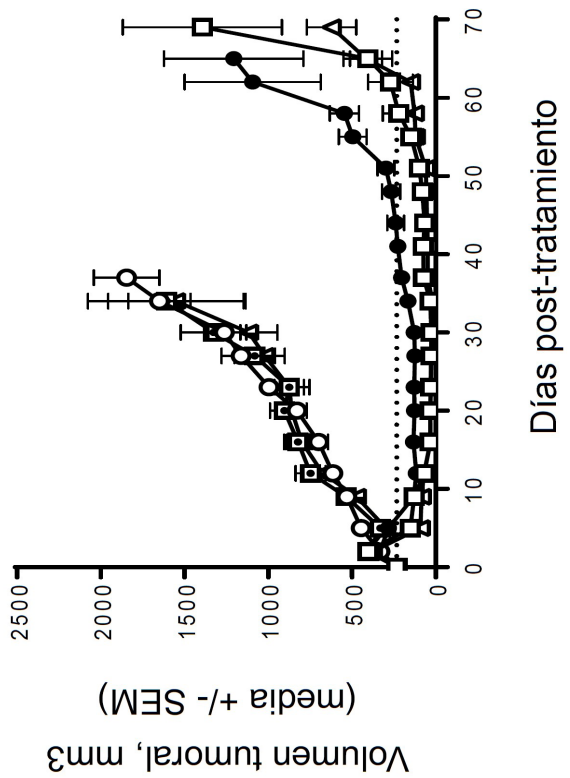

Volumen tumoral, mm3
(media +/- SEM)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Días post-tratamiento
Vehículo IV, dosis única
T-DM1 2 mg/kg, IV, dosis única
AB185-ADL1-D1 DAR8 2 mg/kg, IV, dosis única
D1 0.07 mg/kg, IV, dosis única
AB185-ADL5-D2 DAR8 2 mg/kg, IV, dosis única
D2 0.07 mg/kg, IV, dosis única

FIG. 9

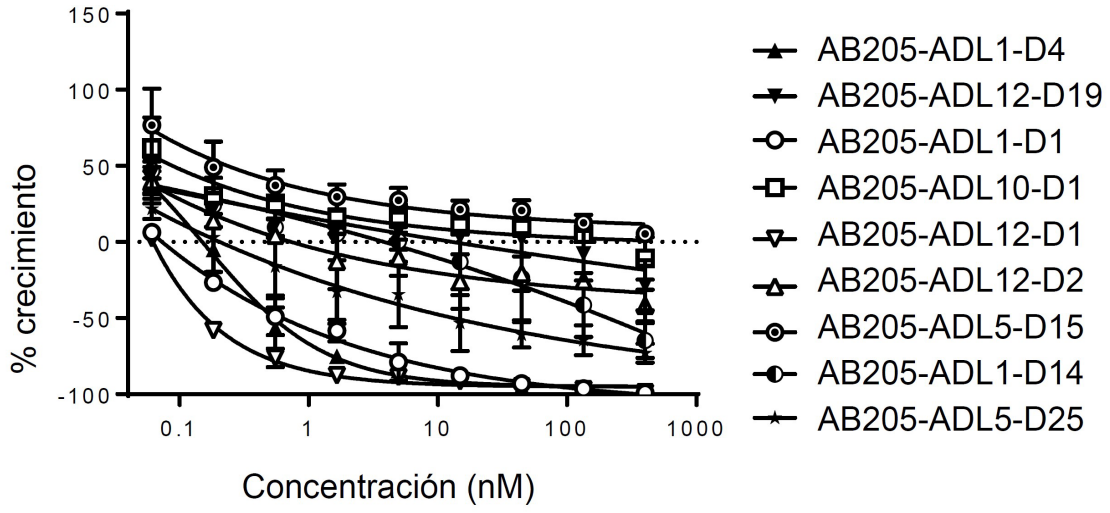

150
100
50
0
-50
-100
% crecimiento
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
AB205-ADL1-D4
AB205-ADL12-D19
AB205-ADL1-D1
AB205-ADL10-D1
AB205-ADL12-D1
AB205-ADL12-D2
AB205-ADL5-D15
AB205-ADL1-D14
AB205-ADL5-D25

FIG. 10

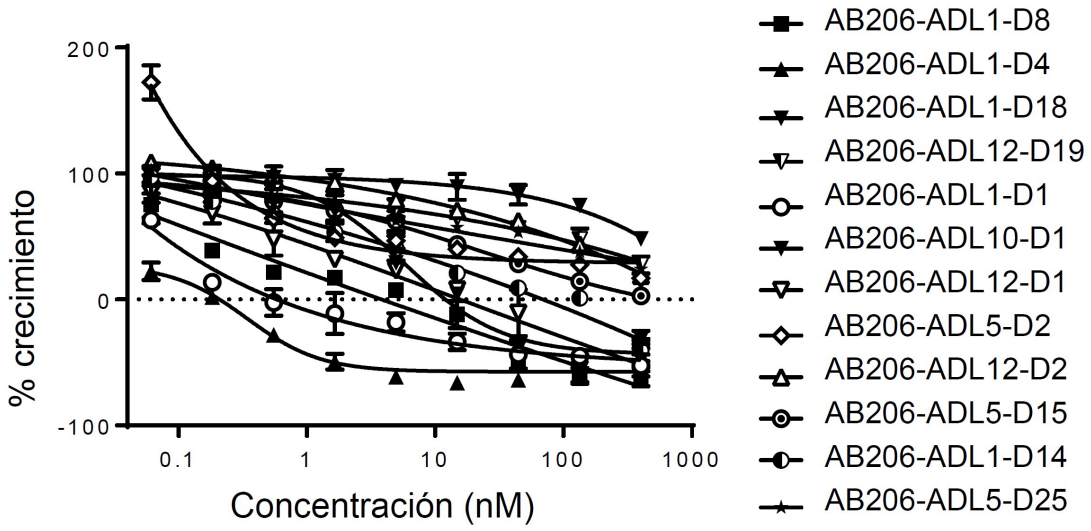

200
100
0
-100
% crecimiento
0.1
1
10
100
1000
Concentración (nM)
AB206-ADL1-D8
AB206-ADL1-D4
AB206-ADL1-D18
AB206-ADL12-D19
AB206-ADL1-D1
AB206-ADL10-D1
AB206-ADL12-D1
AB206-ADL5-D2
AB206-ADL12-D2
AB206-ADL5-D15
AB206-ADL1-D14
AB206-ADL5-D25

FIG. 11

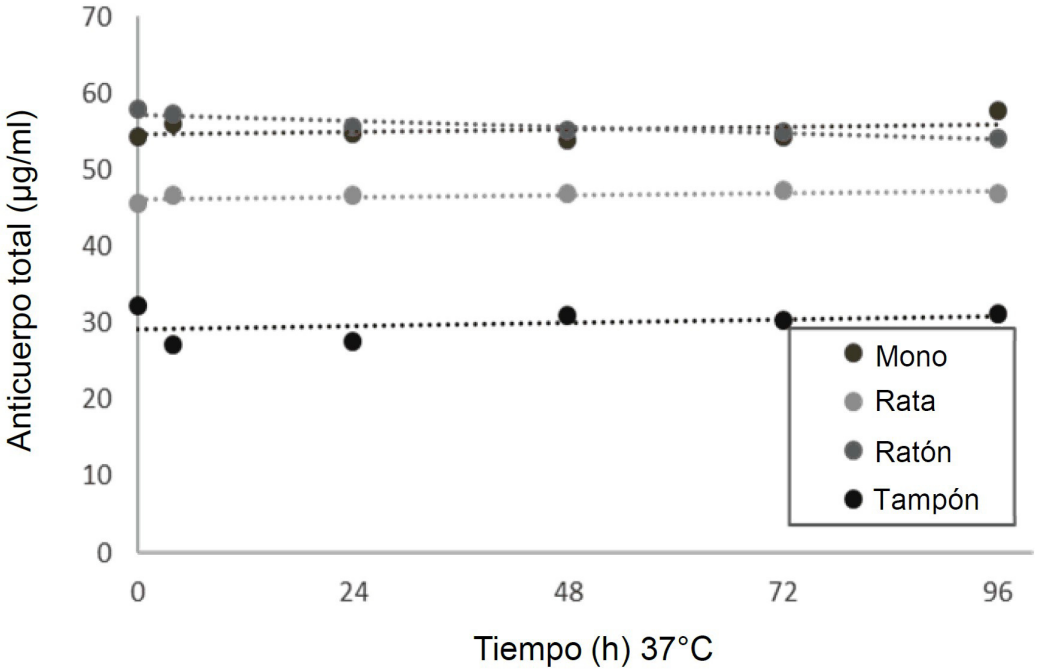

70
60
50
40
30
20
10
0
Anticuerpo total (µg/ml)
0
24
48
72
96
Tiempo (h) 37°C
Mono
Rata
Ratón
Tampón

FIG. 12A

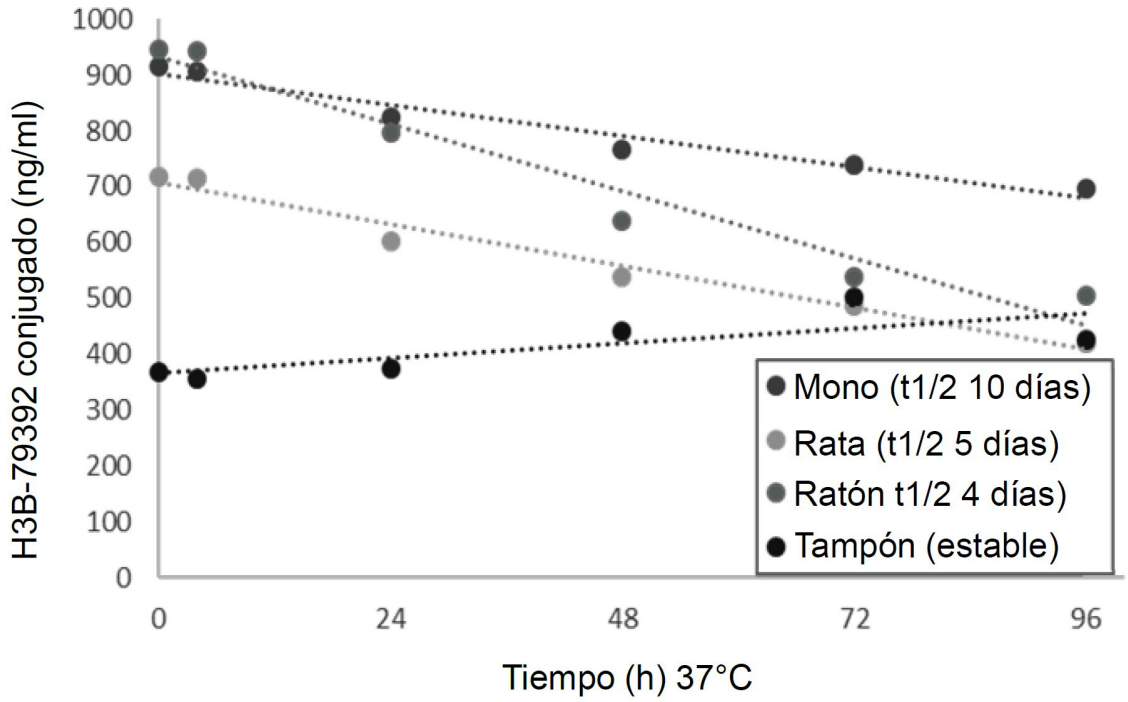

1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
H3B-79392 conjugado (ng/ml)
0
24
48
72
96
Tiempo (h) 37°C
Mono (t1/2 10 días)
Rata (t1/2 5 días)
Ratón t1/2 4 días)
Tampón (estable)

FIG. 12B

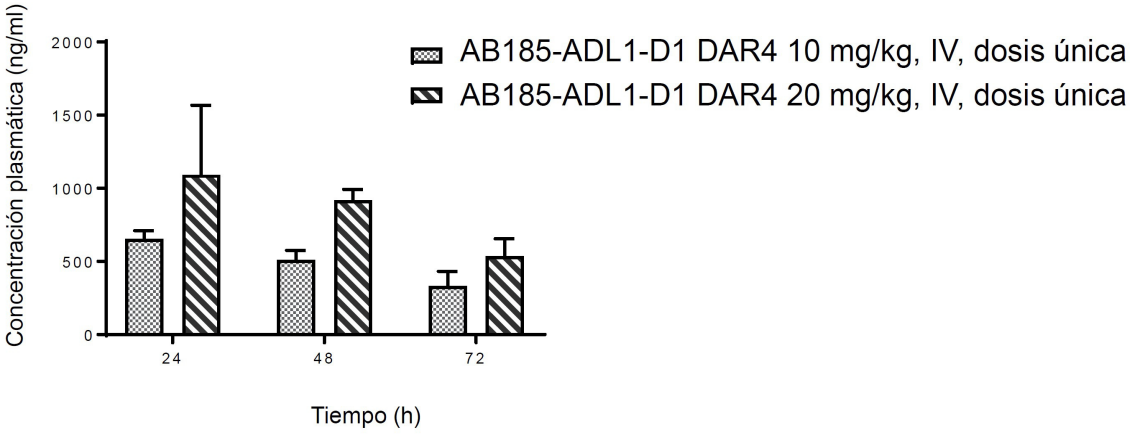

Concentración plasmática (ng/ml)
2000
1500
1000
500
0
24
48
72
Tiempo (h)
AB185-ADL1-D1 DAR4 10 mg/kg, IV, dosis única
AB185-ADL1-D1 DAR4 20 mg/kg, IV, dosis única

FIG. 13

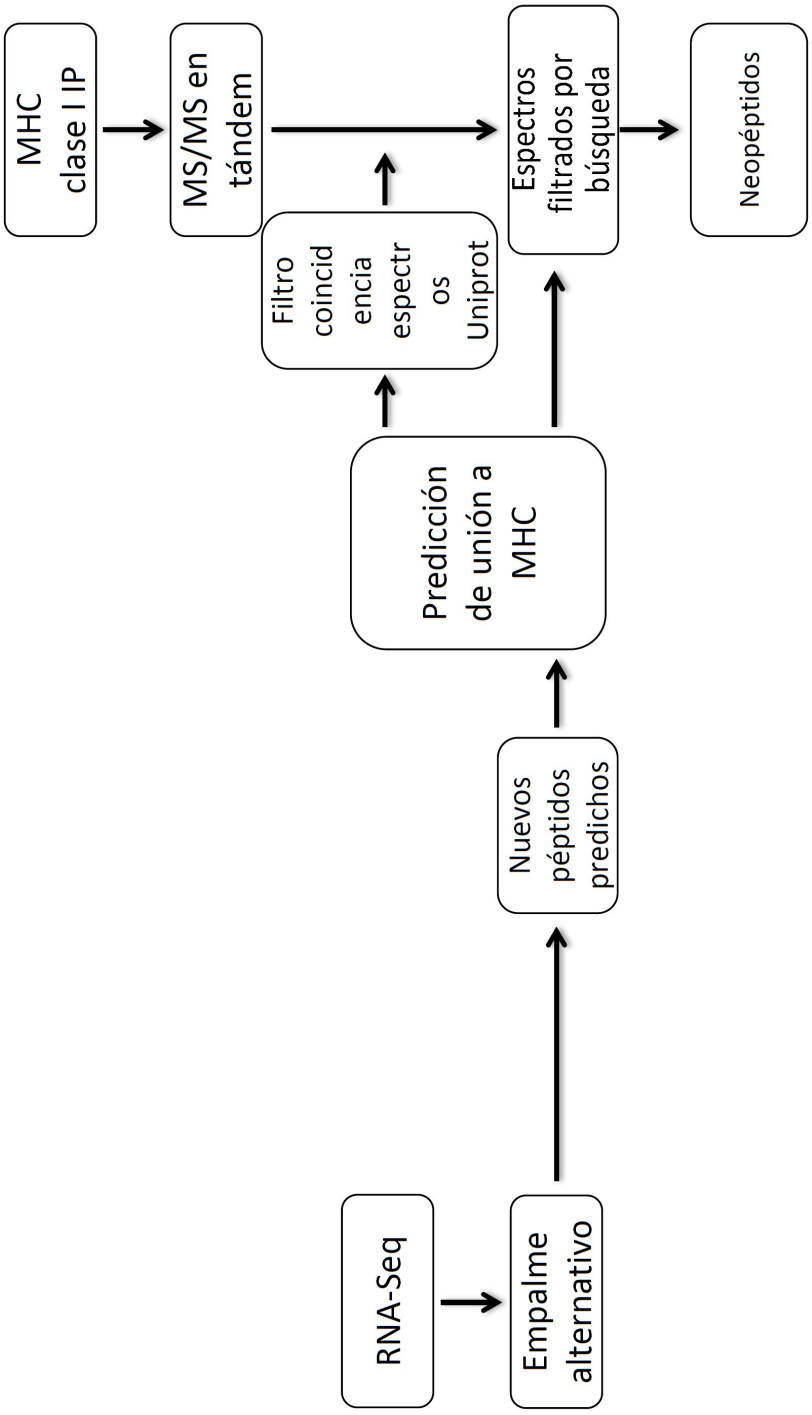

RNA-Seq
Empalme alternativo
Nuevos péptidos predichos
Predicción de unión a MHC
Filtro coincidencia espectros Uniprot
MHC clase I IP
MS/MS en tándem
Espectros filtrados por búsqueda
Neopéptidos

FIG. 14

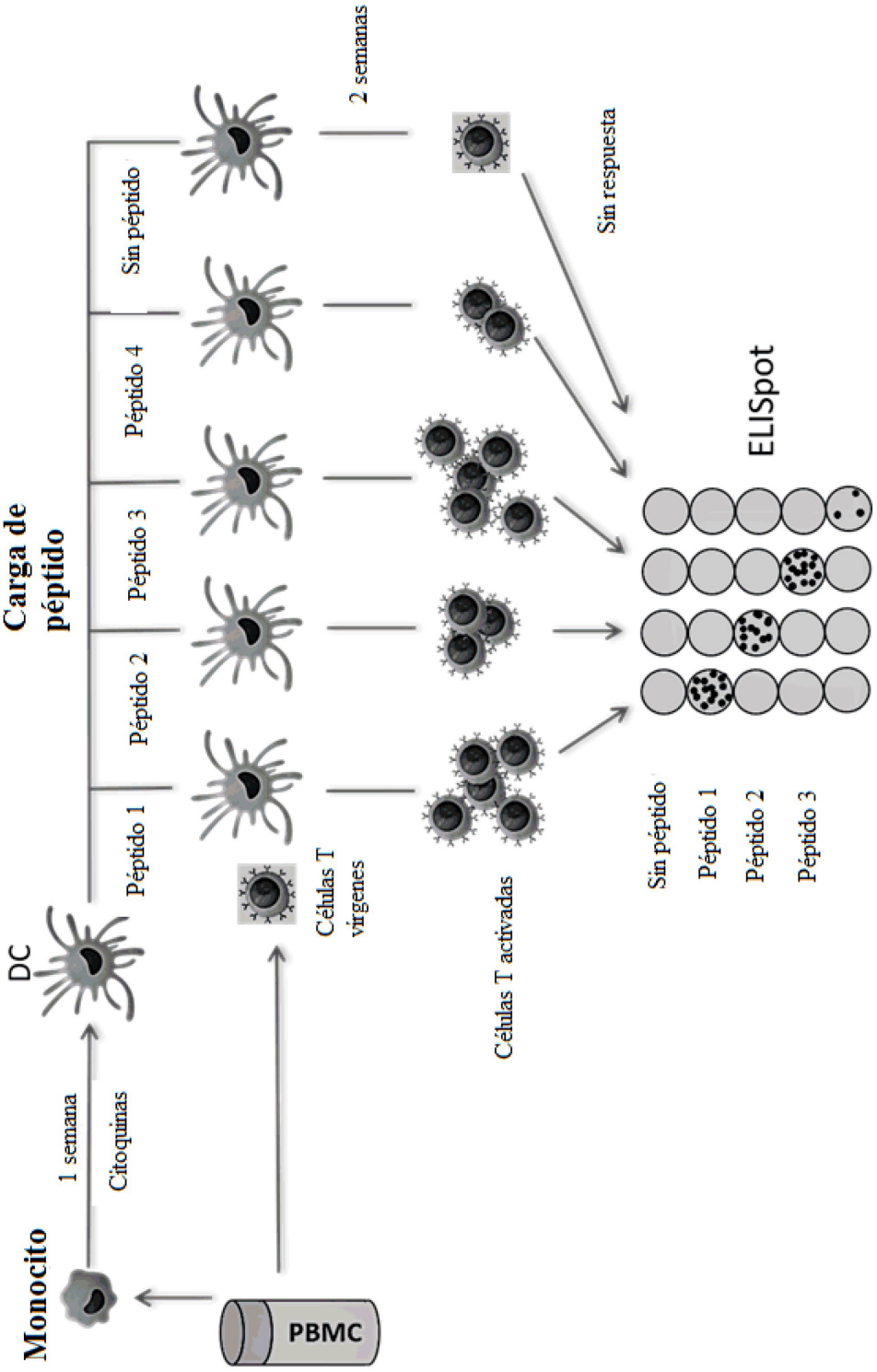

Monocito
1 semana
Citoquinas
DC
PBMC
Carga de péptido
Péptido 1
Péptido 2
Péptido 3
Péptido 4
Sin péptido
Células T vírgenes
2 semanas
Células T activadas
Sin respuesta
ELISpot
Sin péptido
Péptido 1
Péptido 2
Péptido 3

FIG. 15

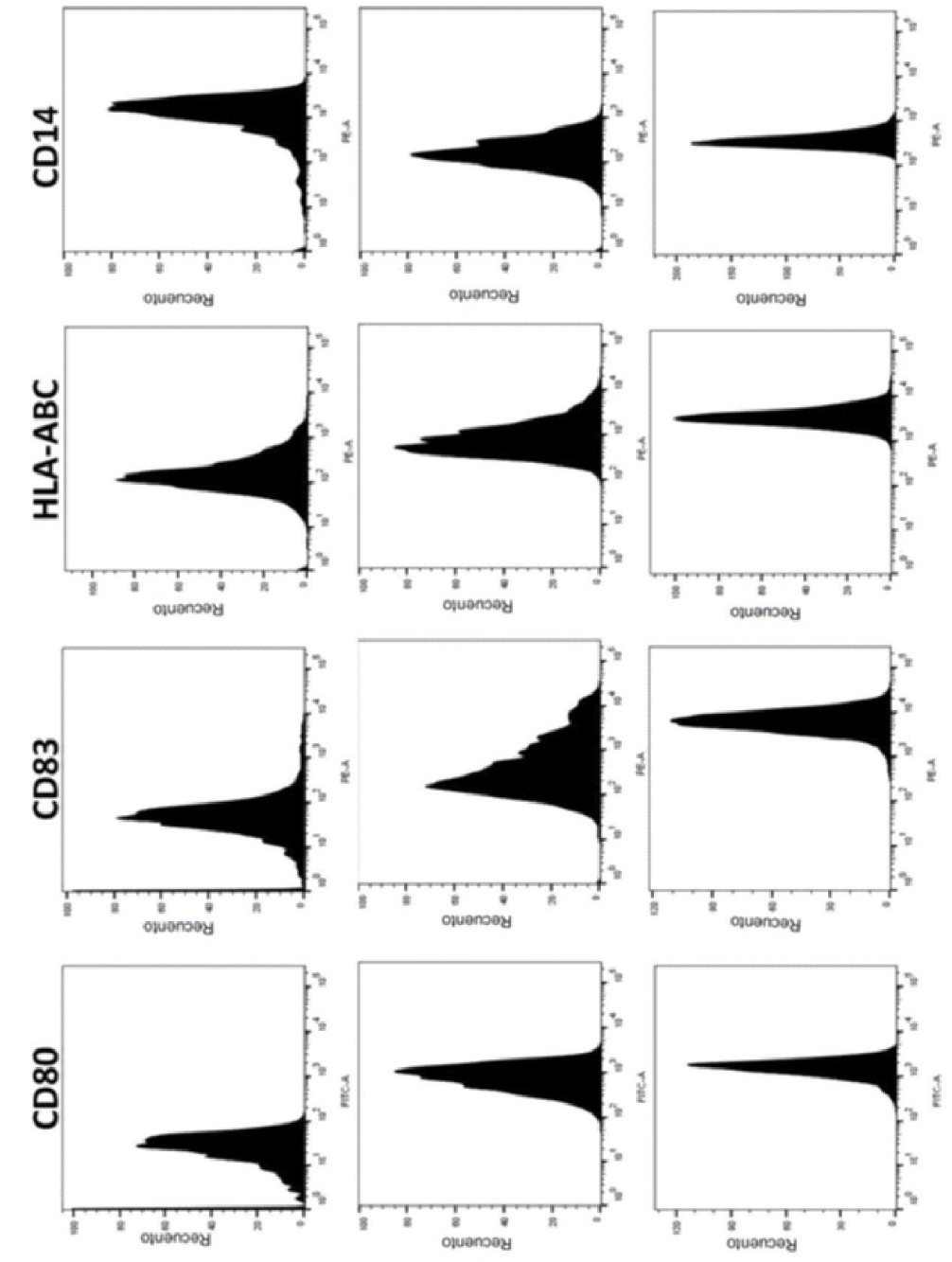

CD80
CD83
HLA-ABC
CD14
Monocitos
imDC
mDC
Recuento
FITC-A
PE-A

FIG. 16

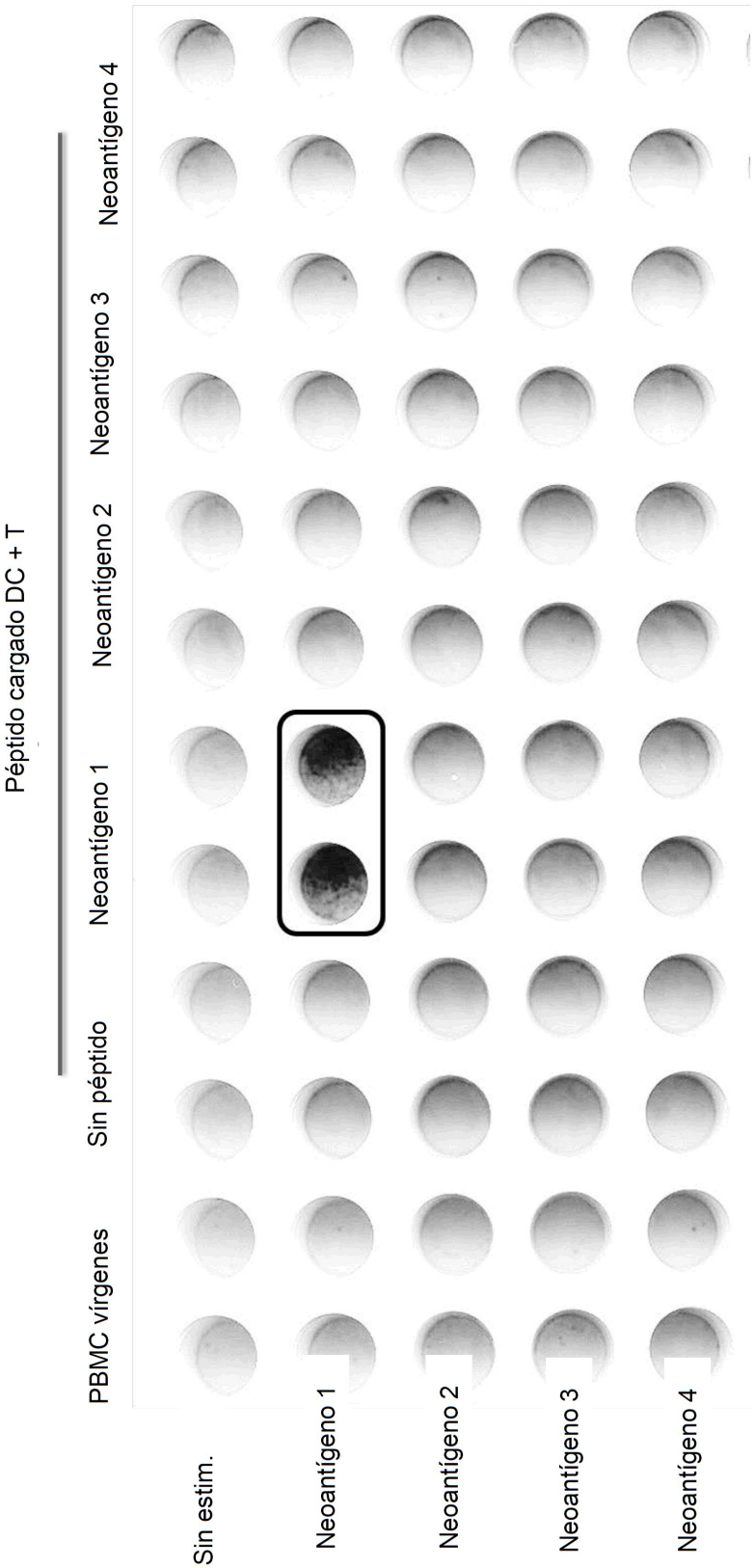

Péptido cargado DC + T
PBMC vírgenes
Sin péptido
Neoantígeno 1
Neoantígeno 2
Neoantígeno 3
Neoantígeno 4
Sin estim.
Neoantígeno 1
Neoantígeno 2
Neoantígeno 3
Neoantígeno 4

FIG. 17A

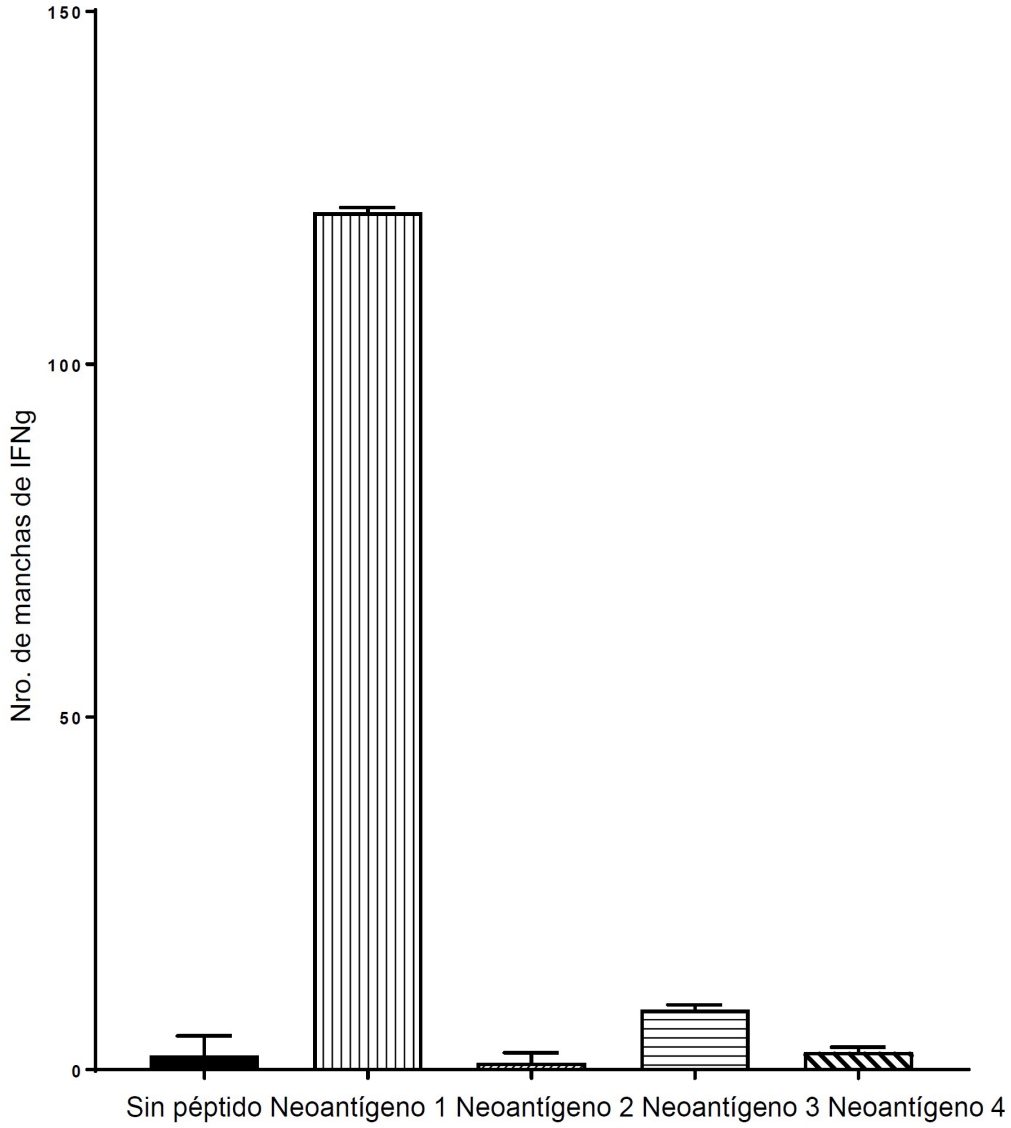

150
100
50
0
Nro. de manchas de IFNg
Sin péptido
Neoantígeno 1
Neoantígeno 2
Neoantígeno 3
Neoantígeno 4

FIG. 17B

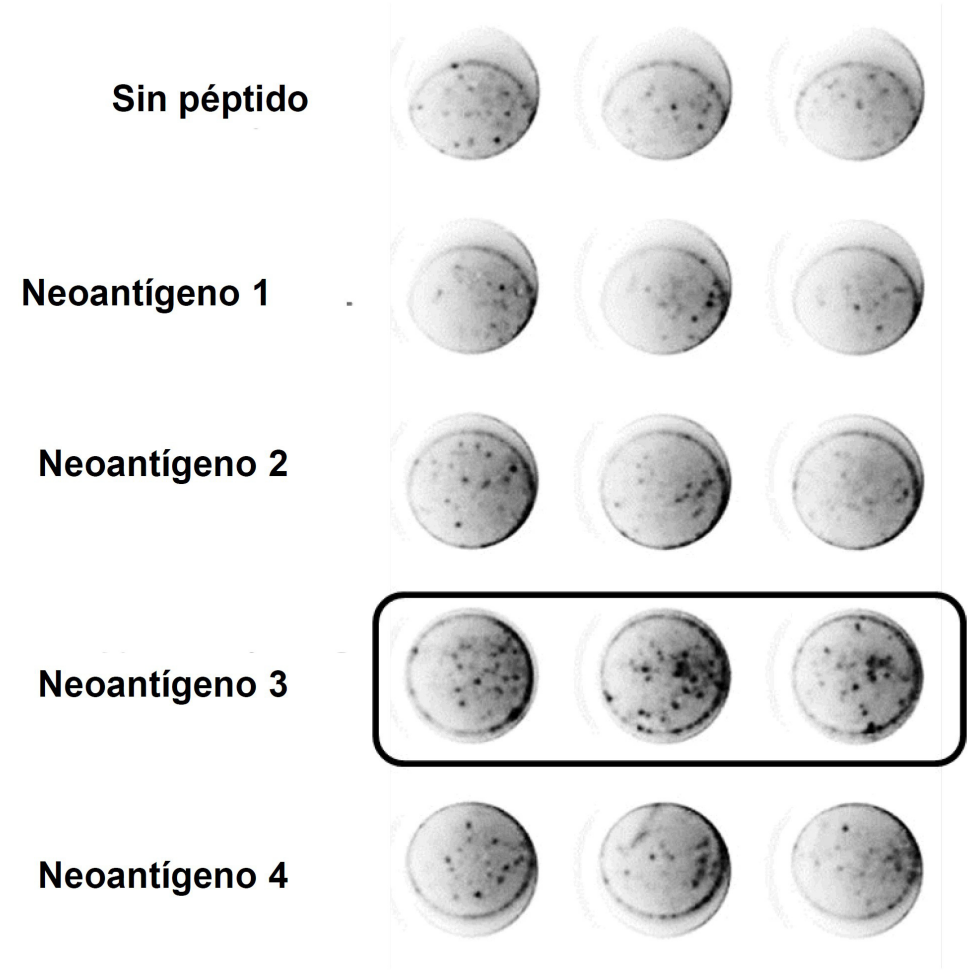

Sin péptido
Neoantígeno 1
Neoantígeno 2
Neoantígeno 3
Neoantígeno 4

FIG. 17C

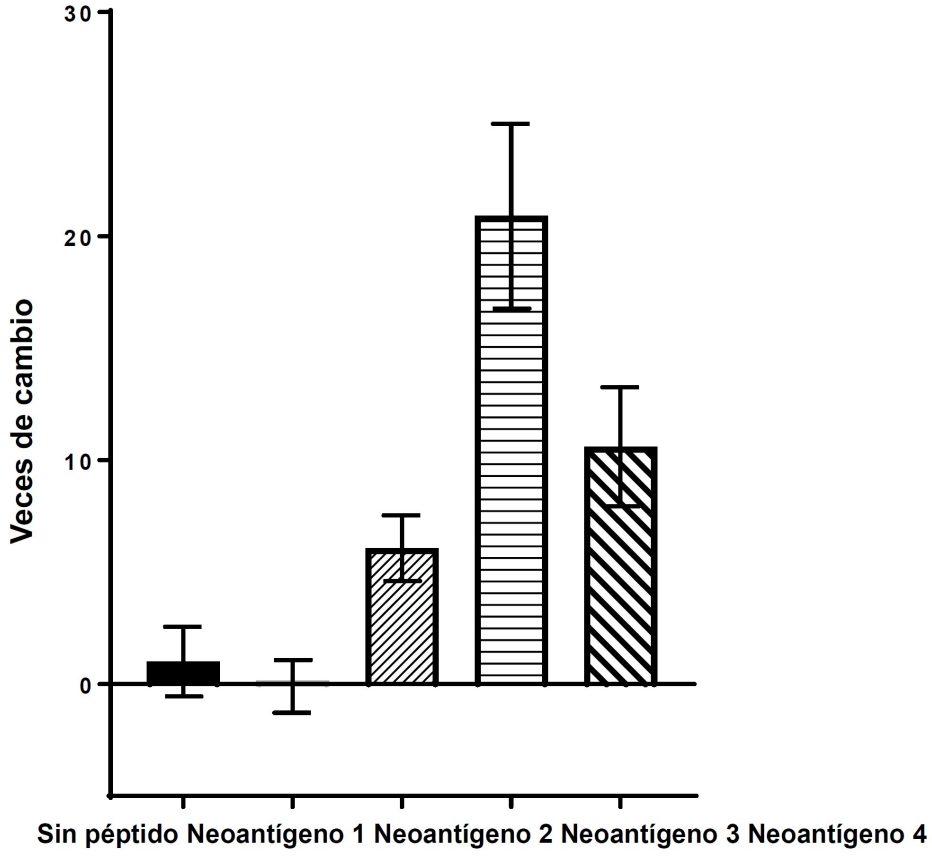

30
20
10
0
Veces de cambio
Sin péptido
Neoantígeno 1
Neoantígeno 2
Neoantígeno 3
Neoantígeno 4

FIG. 17D

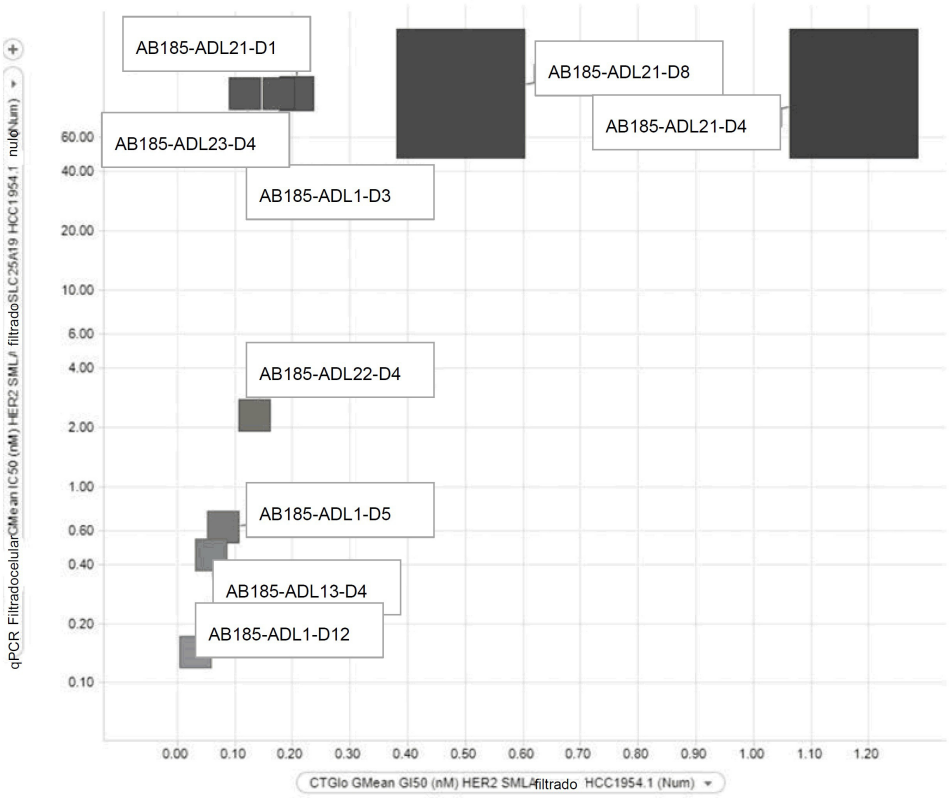

AB185-ADL21-D1
AB185-ADL21-D8
AB185-ADL21-D4
AB185-ADL23-D4
AB185-ADL1-D3
AB185-ADL22-D4
AB185-ADL1-D5
AB185-ADL13-D4
AB185-ADL1-D12
60.00
40.00
20.00
10.00
6.00
4.00
2.00
1.00
0.60
0.40
0.20
0.10
0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
qPCR Filtradocelular GMean IC50 (nM) HER2 SML4 filtrado SLC25A19 HCC1954.1 nuloNum)
CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SML4 filtrado HCC1954.1 (Num)

FIG. 18

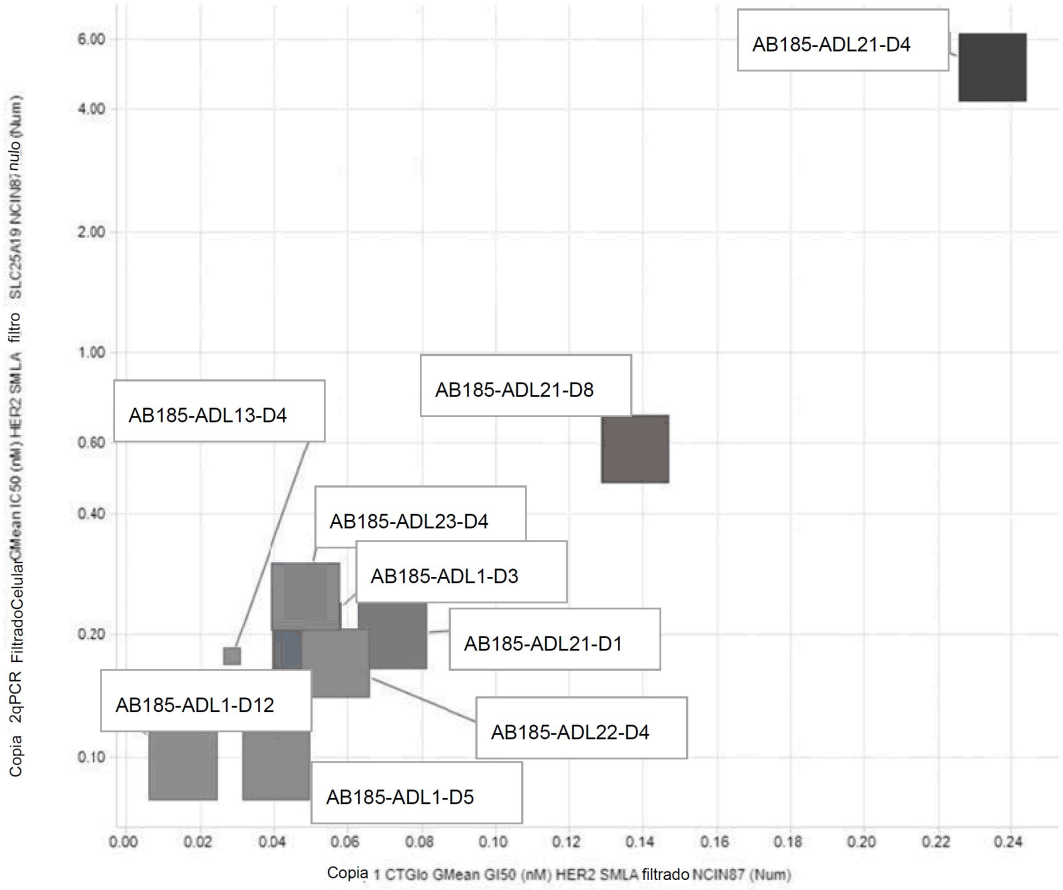

AB185-ADL21-D4
AB185-ADL21-D8
AB185-ADL13-D4
AB185-ADL23-D4
AB185-ADL1-D3
AB185-ADL21-D1
AB185-ADL1-D12
AB185-ADL22-D4
AB185-ADL1-D5
6.00
4.00
2.00
1.00
0.60
0.40
0.20
0.10
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.14
0.16
0.18
0.20
0.22
0.24
Copia 2qPCR FiltradoCelularGMean IC50 (nM) HER2 SMLA filtro SLC25A19 NCIN87 nulo (Num)
Copia 1 CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SMLA filtrado NCIN87 (Num)

FIG. 19

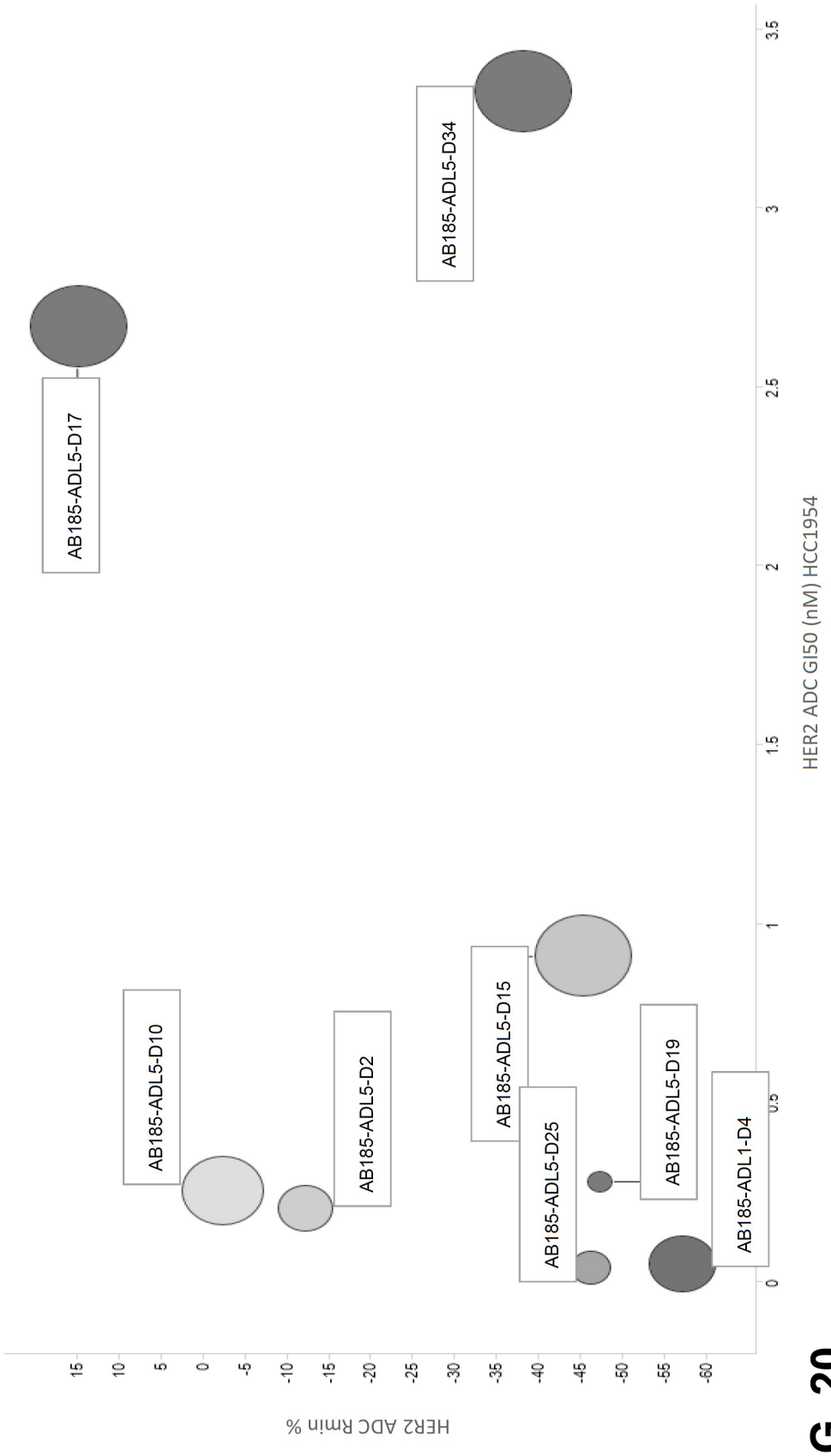

HER2 ADC Rmin %
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
-45
-50
-55
-60
HER2 ADC GI50 (nM) HCC1954
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
AB185-ADL5-D17
AB185-ADL5-D10
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL5-D25
AB185-ADL5-D19
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL5-D34

FIG. 20

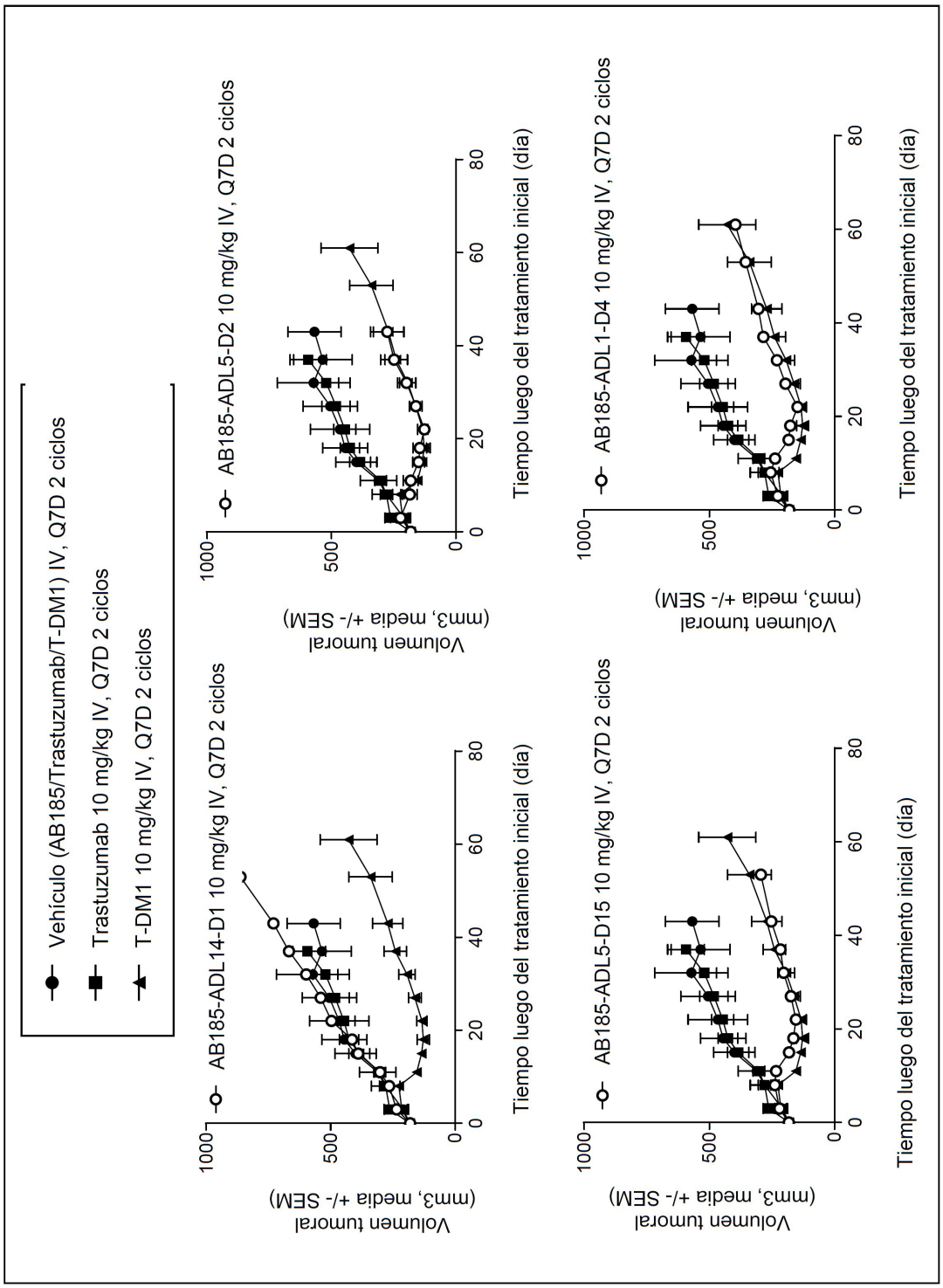

Vehículo (AB185/Trastuzumab/T-DM1) IV, Q7D 2 ciclos
Trastuzumab 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
T-DM1 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL14-D1 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL5-D2 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL5-D15 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL1-D4 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
Volumen tumoral (mm3, media +/- SEM)
Tiempo luego del tratamiento inicial (día)
0
500
1000
0
20
40
60
80

FIG. 21

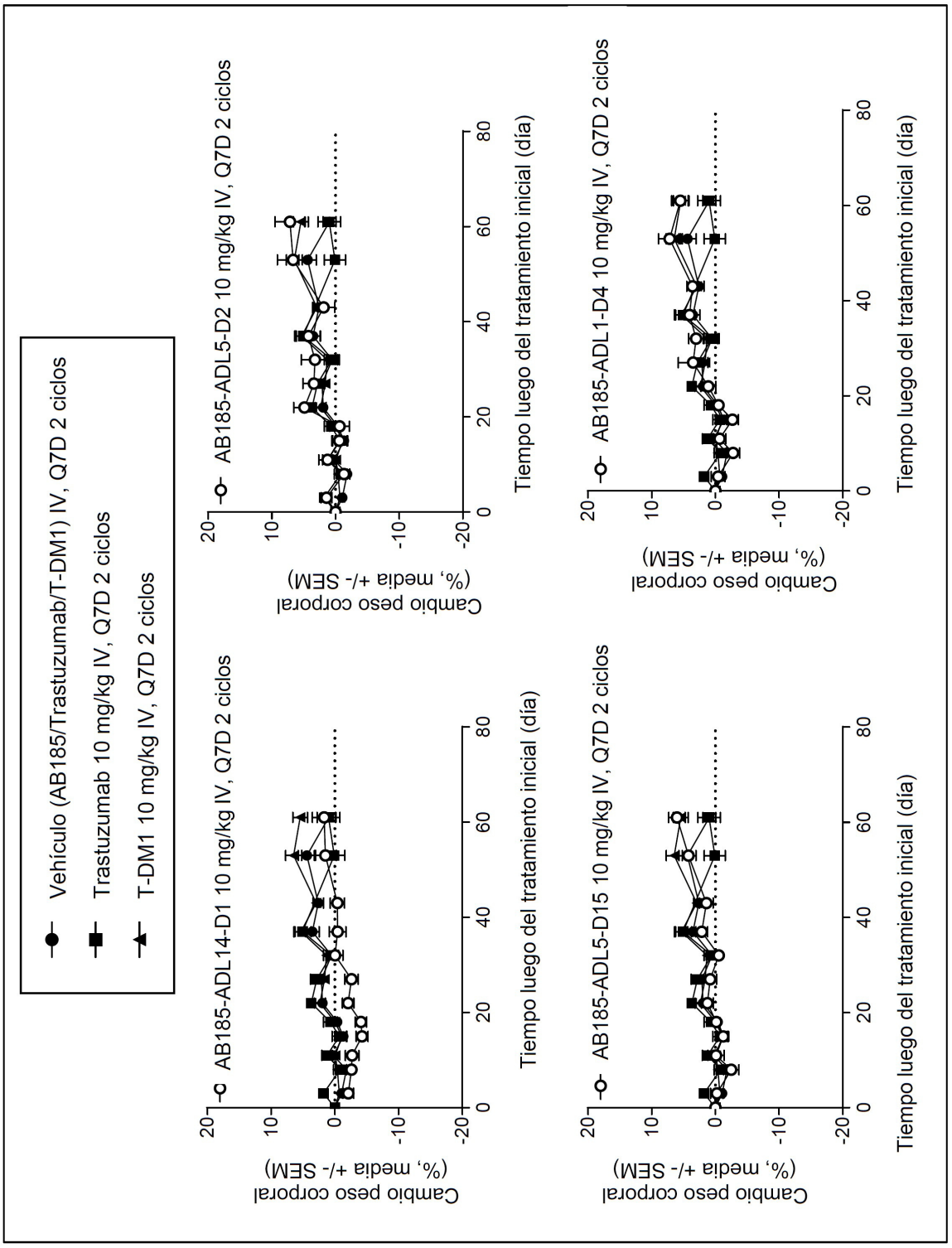

Vehículo (AB185/Trastuzumab/T-DM1) IV, Q7D 2 ciclos
Trastuzumab 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
T-DM1 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL14-D1 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL5-D2 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL5-D15 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL1-D4 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
Cambio peso corporal (%, media +/- SEM)
Tiempo luego del tratamiento inicial (día)
20
10
0
-10
-20
0
20
40
60
80

FIG. 22

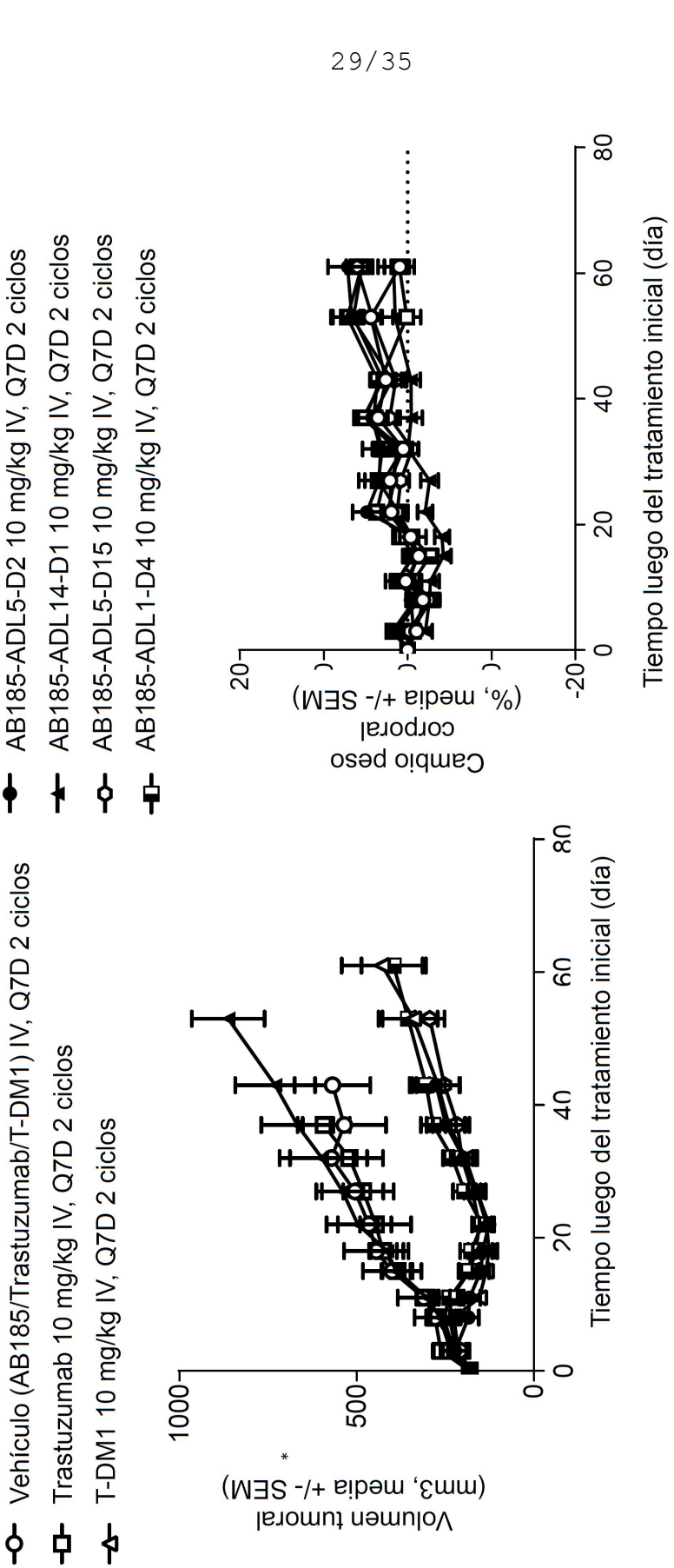

Vehículo (AB185/Trastuzumab/T-DM1) IV, Q7D 2 ciclos
Trastuzumab 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
T-DM1 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL5-D2 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL14-D1 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL5-D15 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
AB185-ADL1-D4 10 mg/kg IV, Q7D 2 ciclos
Volumen tumoral (mm3, media +/- SEM)
*
1000
500
0
0
20
40
60
80
Tiempo luego del tratamiento inicial (día)
Cambio peso corporal (%, media +/- SEM)
20
0
-20
0
20
40
60
80
Tiempo luego del tratamiento inicial (día)

FIG. 23

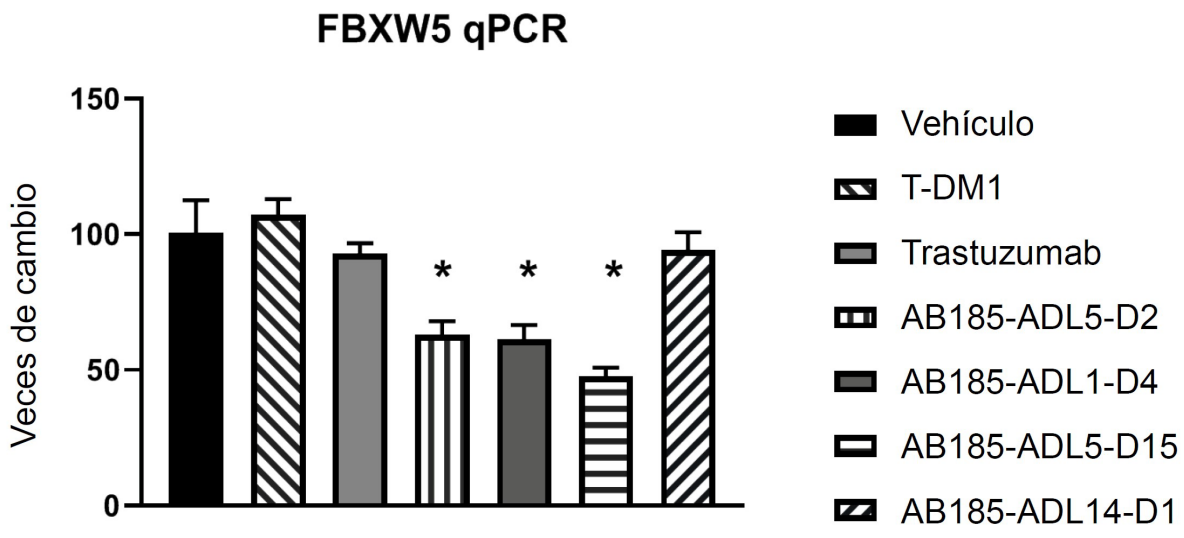

FBXW5 qPCR
Veces de cambio
150
100
50
0
*
*
*
Vehículo
T-DM1
Trastuzumab
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL14-D1

FIG. 24A

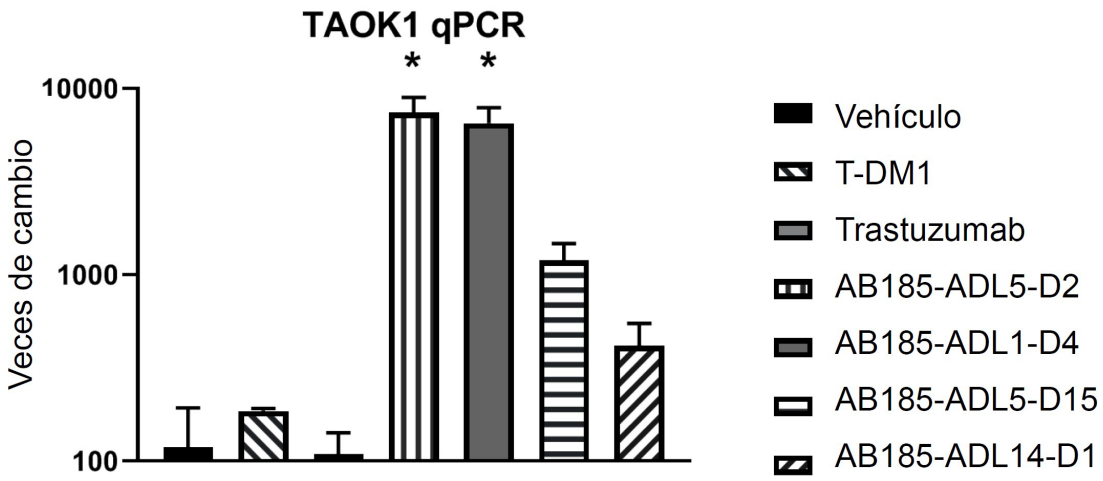

TAOK1 qPCR
* *
10000
1000
100
Veces de cambio
Vehículo
T-DM1
Trastuzumab
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL14-D1

FIG. 24B

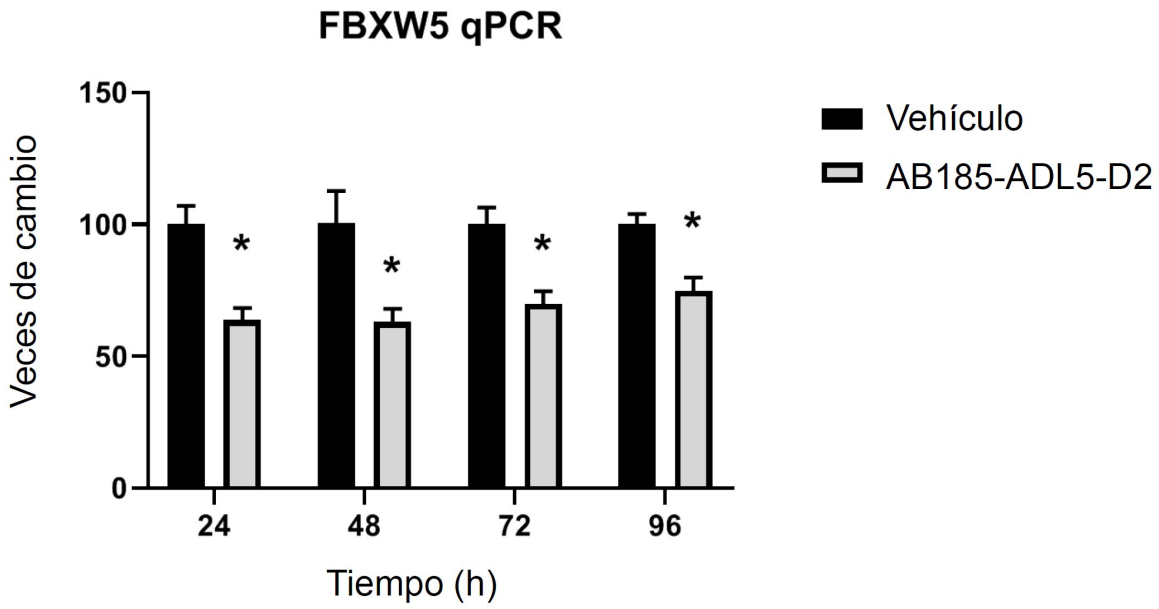

FBXW5 qPCR
Veces de cambio
150
100
50
0
24
48
72
96
Tiempo (h)
Vehículo
AB185-ADL5-D2
*
*
*
*

FIG. 24C

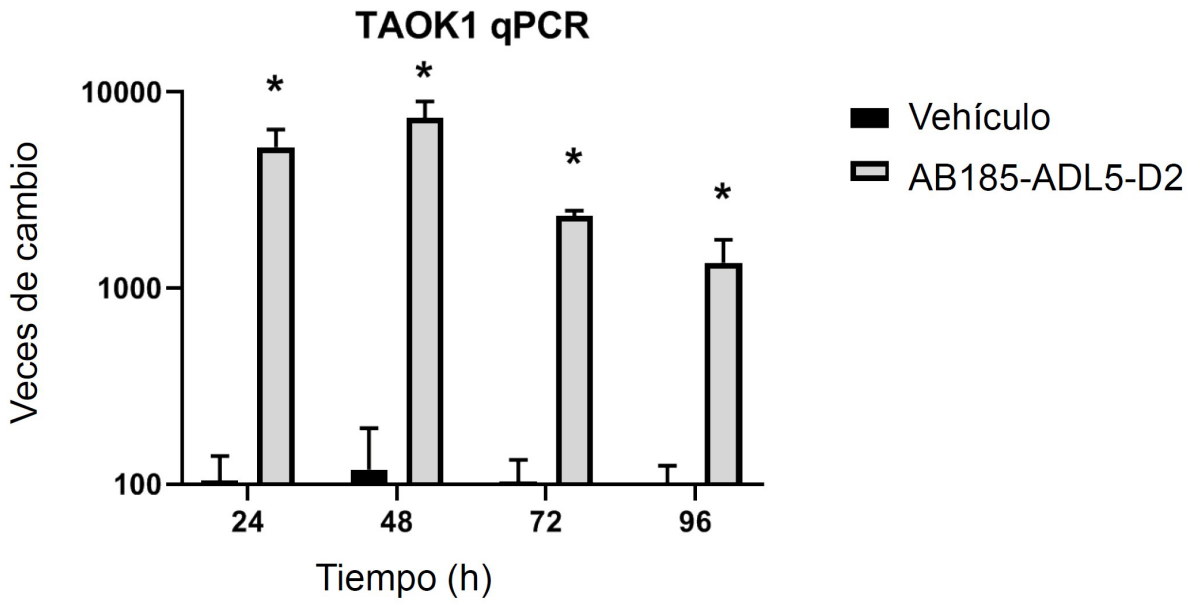

TAOK1 qPCR
Veces de cambio
10000
1000
100
*
*
*
*
24
48
72
96
Tiempo (h)
Vehículo
AB185-ADL5-D2

FIG. 24D

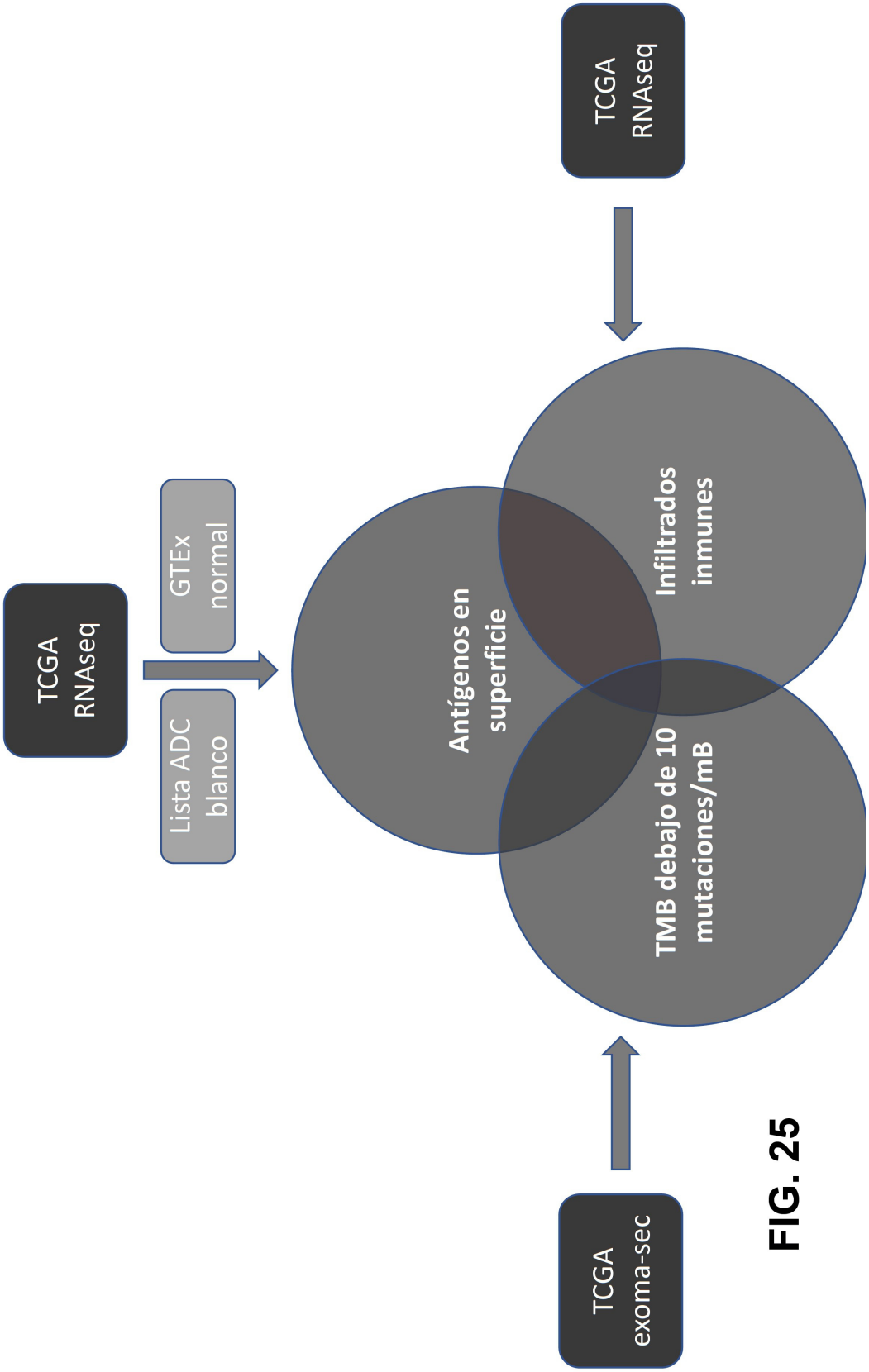

TCGA RNAseq
GTEx normal
Lista ADC blanco
Antígenos en superficie
Infiltrados inmunes
TMB debajo de 10 mutaciones/mB
TCGA RNAseq
TCGA exoma-sec

FIG. 25

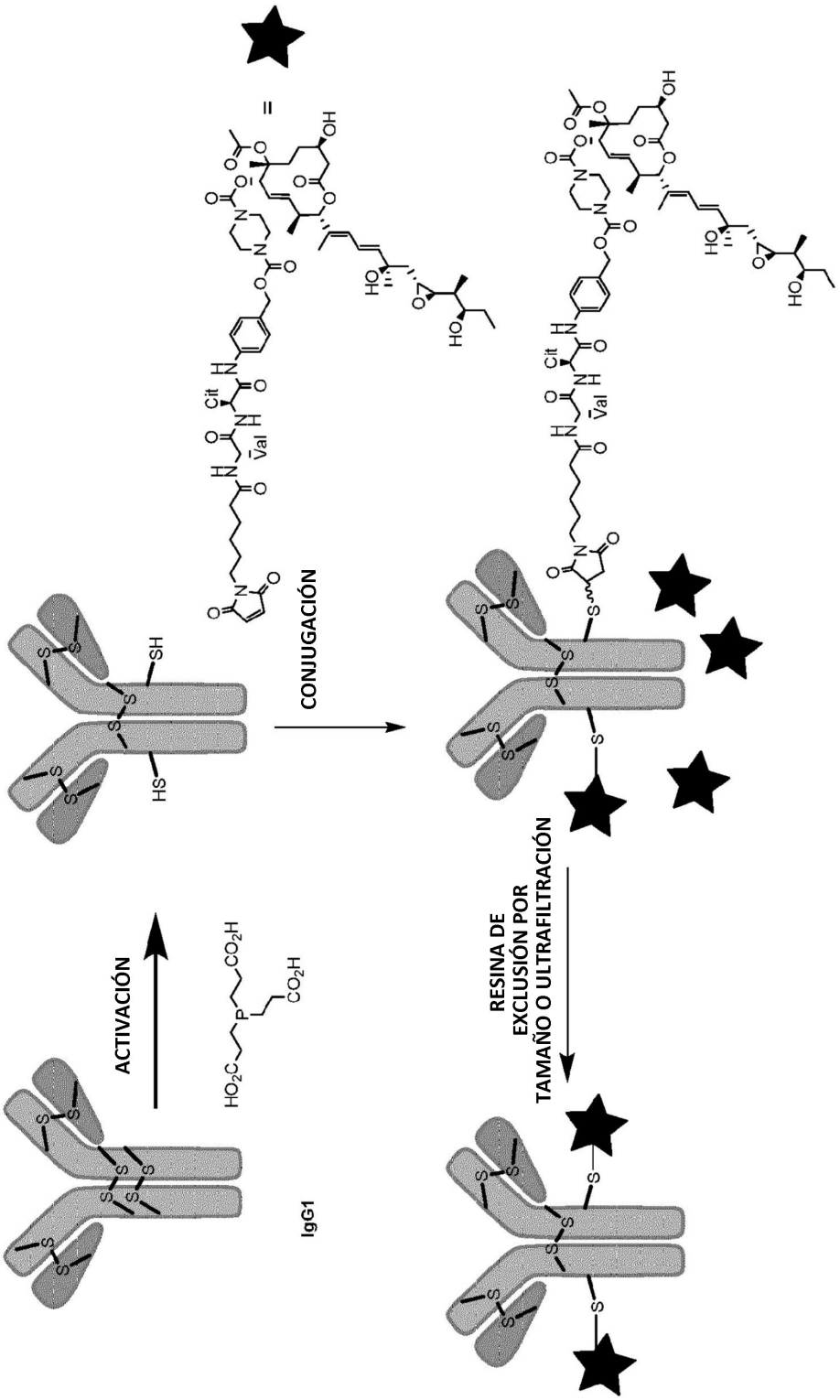

ACTIVACIÓN
IgG1
CONJUGACIÓN
RESINA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO O ULTRAFILTRACIÓN

FIG. 26