

CONJUGADOS DE FÁRMACO-ANTICUERPO CONTRA EL FACTOR TISULAR Y USOS DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/404,447, presentada el 7 de septiembre de 2022 y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/498,233, presentada el 25 de abril de 2023, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un Listado de secuencias legible por computadora que se ha presentado en formato de archivo XML con esta solicitud, cuyo contenido completo se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. El archivo XML del Listado de secuencias presentado con esta solicitud se titula «14529-138-228_SEQ_LISTING.xml», se creó el 5 de septiembre de 2023 y tiene un tamaño de 191.857 bytes.

CAMPO

La presente descripción se refiere, en general, a conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) que se unen al factor tisular (TF, por ejemplo, TF humano) y a métodos para su uso.

INTRODUCCIÓN

La coagulación sanguínea implica un conjunto complejo de procesos que producen la coagulación sanguínea. El factor tisular (TF) cumple una función importante en estos procesos de coagulación. El TF es un receptor de la superficie celular para el factor de serina proteasa VIIa (FVIIa). El complejo TF/FVIIa cataliza la conversión del factor de proteasa inactivo X (FX) en el factor de proteasa activo Xa (FXa). FXa y su cofactor FVa forman el complejo protrombinasa, que genera trombina a partir de protrombina. La trombina convierte el fibrinógeno soluble en hebras insolubles de fibrina y cataliza muchos otros procesos relacionados con la coagulación. El TF está sobreexpresado en múltiples tipos de tumores sólidos. En el cáncer, la señalización de TF/FVIIa puede favorecer la angiogénesis, el avance tumoral y la metástasis.

Los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) han surgido en las últimas dos décadas como una nueva clase de terapias de administración dirigida. Un ADC típico incluye un elemento de direccionamiento basado en anticuerpos unido a un agente farmacéutico altamente potente (carga activa) a través de un enlazador químico mediante el uso de un método de bioconjugación disponible. La relación molar entre el elemento de direccionamiento (por ejemplo, el anticuerpo) y la carga activa adjunta puede variar y se denomina relación de fármaco-anticuerpo (DAR). Los métodos de bioconjugación comúnmente utilizados explotan los residuos de aminoácidos endógenos de una proteína (es decir, lisina y cisteína) o se basan en la participación selectiva de un grupo funcional bioortogonal que se ha introducido intencionalmente en la proteína. Como ejemplo de este último enfoque, el método de conjugación hidrazino-*iso*-Pictet-Spengler (HIPS) (**FIGURA 1**) aprovecha un grupo funcional aldehído (una «etiqueta de aldehído»), que puede

introducirse en una proteína, tal como un anticuerpo, a través de varios medios (por ejemplo, mediante la acción de la enzima generadora de formilo (FGE)), que actúa como control de conjugación. El grupo aldehído reacciona de forma limpia con el resto indol de HIPS para formar un enlace carbono-carbono estable que une permanentemente la carga activa elegida a la proteína en una sola etapa química.

Sigue existiendo una necesidad en la técnica de ADC que puedan dirigirse al TF para tratar, prevenir o aliviar enfermedades, trastornos o afecciones mediadas por el TF, tales aquellas que involucran células tumorales que expresan el TF.

COMPENDIO

La presente descripción proporciona ADC que comprenden un anticuerpo que se une al factor tisular («TF-ADC»). En algunas modalidades, dichos TF-ADC se unen al mismo epítipo del TF humano que un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) descritas en la presente.

La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un TF-ADC que comprende un anticuerpo o fragmento de este que se une a TF («anticuerpo contra TF») y un fármaco conjugado (directa o indirectamente) con este. Dichas composiciones farmacéuticas, en algunas modalidades, incluyen TF-ADC que comprenden un anticuerpo o fragmento de este que se une esencialmente al mismo epítipo de TF humano que un anticuerpo que comprende un VH y un VL descritos en la presente.

La presente descripción también proporciona métodos para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por el TF, tal como aliviar uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección mediada por el TF con un TF-ADC.

Más específicamente, la presente descripción proporciona un TF-ADC que comprende (a) un anticuerpo contra el TF y (b) uno o más restos de acoplamiento de piridazina-pirrolo que comprenden un fármaco conjugado con el resto de acoplamiento de piridazina-pirrolo a través de un enlazador, por ejemplo, mediante el uso del método de conjugación de Hidrazino-*iso*-Pictet-Spengler (HIPS).

Tradicionalmente, el método de conjugación HIPS se ha utilizado para producir conjugados que presentan una carga activa por resto de HIPS por etiqueta de aldehído, que produce conjugados de anticuerpos con valores de DAR de hasta 4. En algunas modalidades, un TF-ADC, tal como se describe en la presente, comprende enlazadores HIPS ramificados que presentan dos (o más) moléculas de la misma carga activa o diferente por un resto de HIPS y, por lo tanto, son capaces de conjugar dos (o más) cargas activas de moléculas pequeñas por un grupo aldehído en una proteína en una sola etapa de conjugación (**FIGURA 2**). En consecuencia, el uso de dichos enlaces ramificados permite la generación de conjugados de específicos del sitio con DAR superiores (por ejemplo, DAR hasta 8) con una ubicación de carga activa controlada, lo que, en el contexto de los ADC terapéuticos, daría como resultado cantidades mayores de agente

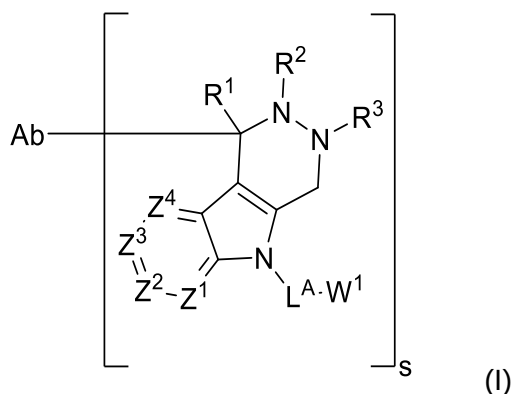
farmacéutico administrado al tejido diana.

La presente descripción proporciona estructuras de TF-ADC, que comprenden (a) un anticuerpo contra TF, (b) un enlazador HIPS ramificado, y (c) un fármaco. La descripción también abarca compuestos y métodos para la producción de dichos conjugados, así como métodos de uso de los conjugados.

Los aspectos de la presente descripción incluyen un TF-ADC que comprende (a) un anticuerpo contra TF; y (b) uno o más restos de acoplamiento de piridazina-pirrolo que comprenden uno o más fármacos conjugados con el resto de acoplamiento de piridazina-pirrolo a través de uno o más enlazadores.

En algunas modalidades, un TF-ADC está representado por la Fórmula (I), el TF-ADC comprende:

- a. un anticuerpo que se une al factor tisular (TF); y
- b. dos o más fármacos conjugados con un resto de acoplamiento piridazina-pirrolo, cada uno a través de un enlazador



en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF;

cada uno de Z¹, Z² y Z⁴ es independientemente CR⁴;

Z³ es C-L^B-W²;

cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ se selecciona de hidrógeno y alquilo;

L^A es un primer enlazador que comprende:

-(T¹-V¹)_a-(T²-V²)_b-(T³-V³)_c-(T⁴-V⁴)_d-(T⁵-V⁵)_e-(T⁶-V⁶)_f,

en donde:

cada uno de a, b, c, d, e y f es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de a, b, c, d, e y f sea 1;

cada uno de T¹, T², T³, T⁴, T⁵ y T⁶ se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C₁-C₁₂), alquilo (C₁-C₁₂) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, (EDA)_w, (PEG)_n, (AA)_p, -(CR¹³OH)_x-, 4-amino-piperidina (4AP), meta-amino-benciloxi (MABO), meta-amino-benciloxycarbonilo (MABC), para-amino-benciloxi (PABO), para-amino-benciloxycarbonilo

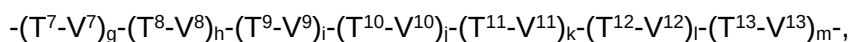
(PABC), para-aminobencilo (PAB), para-amino-bencilamino (PABA), para-amino-fenilo (PAP), para-hidroxi-fenilo (PHP), un grupo acetal, una hidrazina, un disulfuro, y un éster, en donde EDA es un resto etilenodiamina, PEG es un polietilenglicol, y AA es un residuo de aminoácidos o un análogo de aminoácidos, en donde cada w es un número entero de 1 a 20, cada n es un número entero de 1 a 30, cada p es un número entero de 1 a 20, y cada x es un número entero de 1 a 12;

cada uno de V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 y V^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, $-\text{CO}-$, $-\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$, $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$, $-\text{CONR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$ y $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$, en donde cada q es un número entero de 1 a 6;

cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un arilo y un arilo sustituido; y

cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido;

L^{B} es un segundo enlazador que comprende:



en donde:

cada uno de g, h, i, j, k, l y m es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de g, h, i, j, k, l y m sea 1;

cada uno de T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C_1-C_{12}), alquilo (C_1-C_{12}) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, $(\text{EDA})_w$, $(\text{PEG})_n$, $(\text{AA})_p$, $-(\text{CR}^{13}\text{OH})_x-$, 4-amino-piperidina (4AP), meta-amino-benciloxi (MABO), meta-amino-benciloxicarbonilo (MABC), para-amino-benciloxi (PABO), para-amino-benciloxicarbonilo (PABC), para-aminobencilo (PAB), para-amino-bencilamino (PABA), para-amino-fenilo (PAP), para-hidroxi-fenilo (PHP), un grupo acetal, una hidrazina, un disulfuro, y un éster, en donde EDA es un resto etilenodiamina, PEG es un polietilenglicol, y AA es un residuo de aminoácidos o un análogo de aminoácidos, en donde cada w es un número entero de 1 a 20, cada n es un número entero de 1 a 30, cada p es un número entero de 1 a 20, y cada x es un número entero de 1 a 12;

cada uno de V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, $-\text{CO}-$, $-\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$, $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$, $-\text{CONR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$ y $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$, en donde cada q es un número entero de 1 a 6;

cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo

sustituido, un arilo y un arilo sustituido; y

cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido;

s es un número entero de 1 a 10;

W^1 es un primer fármaco; y

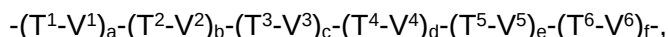
W^2 es un segundo fármaco.

En algunas modalidades, Z^1 es CR^4 .

En algunas modalidades, Z^3 es $C-L^B-W^2$.

En algunas modalidades, uno o ambos de W^1 y W^2 son análogos de camptotecina, por ejemplo, belotecán.

En algunas modalidades, L^A comprende:



en donde

cada uno de a, b, c, d, e y f es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de a, b, c, d, e y f sea 1;

cada uno de T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 y T^6 se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C_1 - C_{12}), alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, (EDA)_w, (PEG)_n, (AA)_p, $-(CR^{13}OH)_x$, 4-amino-piperidina (4AP), meta-amino-benciloxi (MABO), meta-amino-benciloxicarbonilo (MABC), para-amino-benciloxi (PABO), para-amino-benciloxicarbonilo (PABC), para-aminobencilo (PAB), para-amino-bencilamino (PABA), para-amino-fenilo (PAP), para-hidroxi-fenilo (PHP), un grupo acetal, una hidrazina, un disulfuro, y un éster, en donde EDA es un resto etilenodiamina, PEG es un polietilenglicol, y AA es un residuo de aminoácidos o un análogo de aminoácidos, en donde cada w es un número entero de 1 a 20, cada n es un número entero de 1 a 30, cada p es un número entero de 1 a 20, y cada x es un número entero de 1 a 12;

cada uno de V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 y V^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ y $-P(O)OH-$, en donde cada q es un número entero de 1 a 6;

cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un arilo y un arilo sustituido; y

cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido,

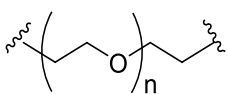
heterociclilo y heterociclilo sustituido.

En algunas modalidades de L^A:

T¹ se selecciona de un alquilo (C₁-C₁₂) y un alquilo (C₁-C₁₂) sustituido;

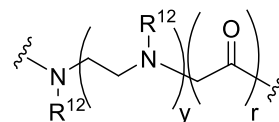
cada uno de T², T³, T⁴, T⁵ y T⁶ se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C₁-C₁₂), alquilo (C₁-C₁₂) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, (EDA)_w, (PEG)_n, (AA)_p, - (CR¹³OH)_x-, 4-amino-piperidina (4AP), MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, PHP, un grupo acetal, una hidrazina y un éster; y

cada uno de V¹, V², V³, V⁴, V⁵ y V⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, -CO-, -NR¹⁵-, -NR¹⁵(CH₂)_q-, -NR¹⁵(C₆H₄)-, -CONR¹⁵-, -NR¹⁵CO-,
,
-C(O)O-, -OC(O)-, -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂NR¹⁵-, -NR¹⁵SO₂- y -P(O)OH-;
en donde:

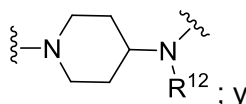
(PEG)_n es , donde n es un número entero de 1 a 30;

EDA es un resto de etilendiamina que tiene la siguiente estructura:

, donde y es un número entero de 1 a 6 y r es 0 o 1;



4-amino-piperidina (4AP) es



cada R¹² se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol, un arilo y un arilo sustituido, en donde cualesquiera dos grupos R¹² adyacentes pueden enlazarse de forma cíclica para formar un anillo piperazinilo;

En modalidades adicionales, cada uno de a, b, c y d es 1; y

e y f son 0.

En algunas modalidades, cada uno de T¹, T², T³, T⁴, T⁵ y T⁶ está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, cada uno de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP y PHP está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, el glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En algunas modalidades, L^A es un enlazador, en donde:

T¹ es alquilo (C₁-C₁₂) y V¹ es -CONH-;

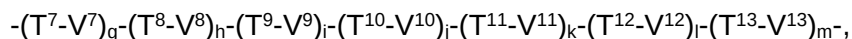
T² es alquilo (C₁-C₁₂) sustituido y V² es -CO-;

T³ es (AA)_p y V³ está ausente;

T^4 es PABC y V^4 está ausente;
 p es un número entero de 1 a 10;
 cada uno de a , b , c y d es 1; y
 cada uno de e y f es 0.

En modalidades adicionales, PABC se sustituye con un glicósido, por ejemplo, un hidrógeno de PABC se reemplaza con un glicósido, tal como un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En algunas modalidades, L^B comprende:



en donde

cada uno de g , h , i , j , k , l y m es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de g , h , i , j , k , l y m sea 1;

cada uno de T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C_1 - C_{12}), alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, $(AA)_p$, $-(CR^{13}OH)_x-$, 4-amino-piperidina (4AP), meta-amino-benciloxi (MABO), meta-amino-benciloxycarbonilo (MABC), para-amino-benciloxi (PABO), para-amino-benciloxycarbonilo (PABC), para-aminobencilo (PAB), para-amino-bencilamino (PABA), para-amino-fenilo (PAP), para-hidroxi-fenilo (PHP), un grupo acetal, una hidrazina, un disulfuro, y un éster, en donde EDA es un resto etilenodiamina, PEG es un polietilenglicol, y AA es un residuo de aminoácidos o un análogo de aminoácidos, en donde cada w es un número entero de 1 a 20, cada n es un número entero de 1 a 30, cada p es un número entero de 1 a 20, y cada x es un número entero de 1 a 12;

cada uno de V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ y $-P(O)OH-$, en donde cada q es un número entero de 1 a 6;

cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un arilo y un arilo sustituido; y

cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

En algunas modalidades, cada uno de T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, cada uno de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP y PHP está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, el glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

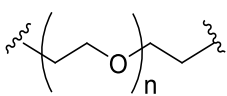
En algunas modalidades de L^B:

T⁷ es un enlace covalente;

cada uno de T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹ y T¹² se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C₁-C₁₂), alquilo (C₁-C₁₂) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, (EDA)_w, (PEG)_n, (AA)_p, -(CR¹³OH)_x-, 4-amino-piperidina (4AP), MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, PHP, un grupo acetal, una hidrazina y un éster; y

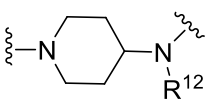
cada uno de V⁷, V⁸, V⁹, V¹⁰, V¹¹ y V¹² se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, -CO-, -NR¹⁵-, -NR¹⁵(CH₂)_q-, -NR¹⁵(C₆H₄)-, -CONR¹⁵-, -NR¹⁵CO-, -C(O)O-, -OC(O)-, -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂NR¹⁵-, -NR¹⁵SO₂- y -P(O)OH-;

en donde:

(PEG)_n es , donde n es un número entero de 1 a 30;

EDA es un resto de etilendiamina que tiene la siguiente estructura:

, donde y es un número entero de 1 a 6 y r es 0 o 1;

4-amino-piperidina (4AP) es ; y

cada R¹² se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol, un arilo y un arilo sustituido, en donde cualesquiera dos grupos R¹² adyacentes pueden enlazarse de forma cíclica para formar un anillo piperazinilo;

cada uno de g, h, i, j y k es 1; y

l y m son 0.

En algunas modalidades, cada uno de T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹ y T¹² está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, cada uno de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP y PHP está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, el glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En algunas modalidades, L^B es un enlazador, en donde:

T⁷ está ausente y V⁷ es -NHCO-;

T⁸ es alquilo (C₁-C₁₂) y V⁸ es -CONH-;

T^9 es alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido y V^9 es $-CO-$;

T^{10} es $(AA)_p$ y V^{10} está ausente;

T^{11} es PABC y V^{11} está ausente;

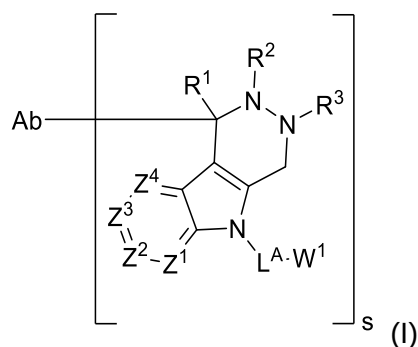
p es un número entero de 1 a 10;

cada uno de g , h , i , j y k es 1; y

cada uno de l y m es 0.

En modalidades adicionales, PABC se sustituye con un glicósido, por ejemplo, un hidrógeno de PABC se reemplaza con un glicósido, tal como un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En algunas modalidades, un TF-ADC está representado por la Fórmula (I):



en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF;

cada uno de Z^1 , Z^2 y Z^4 es independientemente CR^4 ;

Z^3 es $C-L^B-W^2$;

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se selecciona de hidrógeno y alquilo (C_1 - C_{12});

L^A es un primer enlazador, en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es $-CONH-$;

T^2 es alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido y V^2 es $-CO-$;

T^3 es $(AA)_p$, donde p es un número entero de 1-20 y V^3 es un enlace covalente;

T^4 es PABC y V^4 es un enlace covalente;

cada uno de a , b , c y d es 1;

cada uno de e y f es 0; y

L^B es un segundo enlazador, en donde

T^7 es un enlace covalente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^8 es $-CONH-$;

T^9 es alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido y V^9 es $-CO-$;

T^{10} es $(AA)_p$, donde p es un número entero de 1-20 y V^{10} es un enlace covalente;

T^{11} es PABC y V^{11} es un enlace covalente; y

cada uno de g , h , i , j y k es 1; y

cada uno de l y m es 0;

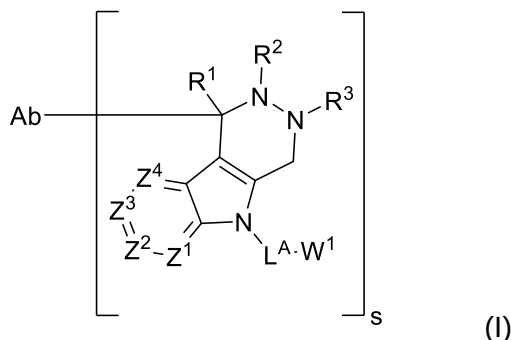
s es un número entero de 1 a 10;

W^1 es un primer fármaco; y

W^2 es un segundo fármaco.

En algunas modalidades, uno o ambos de W^1 y W^2 son análogos de camptotecina, por ejemplo, belotecán.

En algunas modalidades, un TF-ADC está representado por la Fórmula (I):



en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF;

cada uno de Z^1 , Z^2 y Z^4 es independientemente CR^4 ;

Z^3 es $C-L^B-W^2$;

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se selecciona de hidrógeno y alquilo (C_1 - C_{12});

L^A es un enlazador, en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_6) y V^1 es $-CONH-$;

T^2 es alquileo (C_1 - C_6) sustituido con $-NHCO(PEG)_k$, en donde k es un número entero de 2 a 10 y V^2 es $-CO-$;

T^3 es $(AA)_2$ y V^3 es un enlace covalente;

T^4 es PABC sustituido con un glicósido y V^4 es un enlace covalente;

cada uno de a, b, c y d es 1; y

cada uno de e y f es 0; y

L^B es un enlazador, en donde

T^7 es un enlace covalente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1 - C_6) y V^8 es $-CONH-$;

T^9 es alquileo (C_1 - C_6) sustituido con $-NHCO(PEG)_k$, en donde k es un número entero de 2 a 10 y V^9 es $-CO-$;

T^{10} es $(AA)_2$ y V^{10} es un enlace covalente;

T^{11} es PABC sustituido con un glicósido y V^{11} es un enlace covalente;

cada uno de g, h, i, j y k es 1; y

cada uno de l y m es 0;

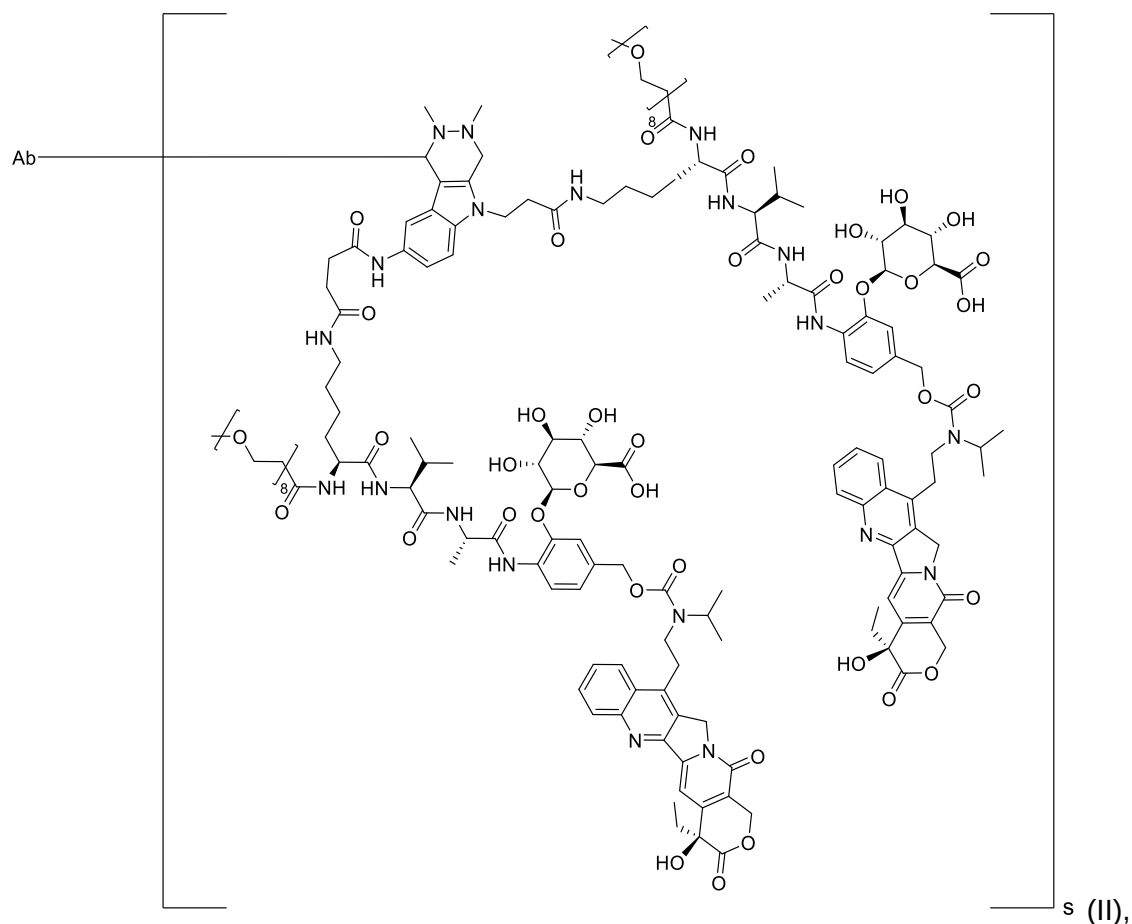
s es un número entero de 1 a 10;

W^1 es un primer fármaco; y

W^2 es un segundo fármaco.

En algunas modalidades, el PABC de uno o ambos de T^4 y T^{11} está sustituido con un glucurónido. En algunas modalidades, uno o ambos de T^1 y T^8 es etilo. En algunas modalidades, uno o ambos de T^2 y T^9 es alquileo C_5 sustituido con $-NHCO(PEG)_k$, donde k es un número entero de 5-10. En algunas modalidades, uno o ambos de W^1 y W^2 son análogos de camptotecina, por ejemplo, belotecán.

En algunas modalidades, un TF-ADC está representado por la Fórmula (II):



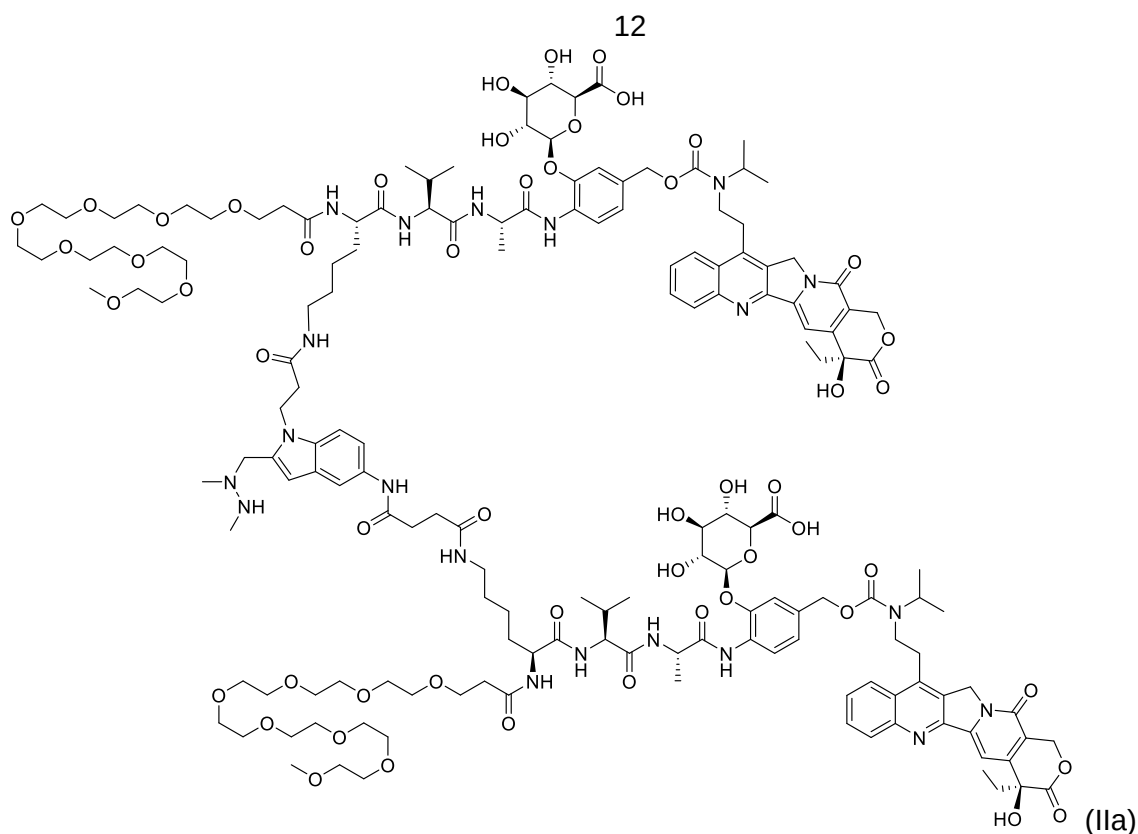
en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF; y

s es un número entero de 1 a 10.

En algunas modalidades, s es un número entero de 1 a 4.

La Fórmula (II) puede prepararse conjugando una o más cargas activas de enlazador con la Fórmula (IIa), que se muestran a continuación, con un anticuerpo contra TF:



En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde el Ab comprende: una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH, tal como se indica en una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25, y una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL, tal como se indica en una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde el Ab comprende: una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH, tal como se indica en una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41, y una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL, tal como se indica en una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende: (i) una región VH que comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:1, 7, 8, 15, 21, 27, 31, 32, 35 o 39, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:2, 9, 14, 16 o 22, y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:3, 10, 17 o 23; y (ii) una región VL que comprende una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:4, 11, 18, 24, 28, 33, 36 o 40, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:5, 12, 19, 29 o 37, y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:6, 13, 20, 30, 34 o 38.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab compite con cualquiera de los anticuerpos contra TF, tal como se describe en la

presente, para unirse a TF.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende una secuencia de un marco 1 (FR1), un marco 2 (FR2), un marco 3 (FR3) y/o un marco 4 (FR4), tal como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO:25, 26, 41 y 42.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende secuencias marco humanas.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II) en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82. De manera adicional o alternativa, Ab comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II) en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:79. De manera adicional o alternativa, Ab comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:79 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende (i) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II) en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85. De manera adicional o alternativa, Ab comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92.

En algunas modalidades, un TF-ADC puede estar representado mediante la Fórmula (I) o (II) en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88. De manera adicional o alternativa, Ab comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, un TF-ADC puede

estar representado mediante la Fórmula (I) o (II), en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:88 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92.

La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende un TF-ADC, en donde el TF-ADC puede estar representado por la Fórmula (I) o la Fórmula (II) y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo contra TF (Ab TF o Ab) es tal como se describe en cualquier modalidad descrita en la presente. En algunas modalidades, dicha composición farmacéutica puede tener una relación de fármaco-anticuerpo (DAR) del TF-ADC de alrededor de 1 a alrededor de 20, por ejemplo, una DAR de alrededor de 2 a alrededor de 8, de alrededor de 1 a alrededor de 4, de alrededor de 2 a alrededor de 4, de alrededor de 3 a alrededor de 4, alrededor de 4, de alrededor de 1 a alrededor de 8, de alrededor de 2 a alrededor de 8, de alrededor de 3 a alrededor de 8, de alrededor de 4 a alrededor de 8, de alrededor de 5 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 8, de alrededor de 6,5 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 7, de alrededor de 6,5 a alrededor de 7,5, de alrededor de 7 a alrededor de 8, alrededor de 6,5, alrededor de 7, alrededor de 7,5, o alrededor de 8.

La presente descripción también proporciona un método para tratar un cáncer o un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto el TF-ADC, en donde el TF-ADC puede estar representado por la Fórmula (I) o (II) o la composición farmacéutica que comprende un TF-ADC con la Fórmula (I) o (II) y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo contra TF es tal como se describe en cualquier modalidad de la presente.

En la presente se proporciona un kit que comprende el conjugado de fármaco anticuerpo, tal como se describe en la presente, o la composición farmacéutica, tal como se describe en la presente, e instrucciones de uso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **FIGURA 1** muestra un dibujo esquemático de la ligadura de HIPS para la síntesis de ADC. Los anticuerpos portadores de restos de aldehído se hacen reaccionar con un enlazador de Hidrazino-*iso*-Pictet-Spengler (HIPS) y una carga activa para generar un ADC conjugado específicamente del sitio con un enlace azacarbolino estable.

La **FIGURA 2** muestra una representación esquemática de la ligadura de HIPS ramificada para la síntesis de ADC. Los anticuerpos que presentan cuatro restos de aldehído se hacen reaccionar con un enlazador HIPS ramificado para generar ADC con un valor de fármaco a anticuerpo (DAR) de hasta 8, de acuerdo con modalidades de la presente descripción.

La **FIGURA 3A** muestra un gráfico de las concentraciones totales de anticuerpo y ADC para análisis farmacocinético (PK) de muestras. Cuadrado: **TF-ADC 6-8** – medición de mAb total; triángulo: **TF-ADC 6-8** – medición de ADC total.

La **FIGURA 3B** muestra un gráfico de las concentraciones totales de anticuerpo y ADC para análisis farmacocinético (PK) de muestras. Rombo: **TF-ADC 6-4** – medición de mAb total;

estrella: **TF-ADC 6-4** – medición de ADC total.

La **FIGURA 3C** muestra un gráfico de las concentraciones totales de anticuerpo y ADC para análisis farmacocinético (PK) de muestras. Triángulo invertido: **TF-ADC 7-8** – medición de mAb total; cruz: **TF-ADC 7-8** – medición de ADC total.

La **FIGURA 3D** muestra un gráfico de las concentraciones totales de anticuerpo y ADC para análisis farmacocinético (PK) de muestras. Estrella: **TF-ADC 7-4** – medición de mAb total; signo de más: **TF-ADC 7-4** – medición de ADC total.

La **FIGURA 4** muestra gráficos de ensayos de citotoxicidad *in vitro* de fármacos libres, es decir, monometil auristatina E (MMAE), belotecán o un derivado de exatecán DxD, en varias líneas de células cancerosas positivas para TF, incluidas RF/6A, A431, HCT-116, BxPC3, AU-565, HPAF-II, MDA-MB-231, AsPC-1, HCC1954 y SKOV-3.

La **FIGURA 5** muestra gráficos de ensayos de citotoxicidad *in vitro* del anticuerpo contra TF **TF-ADC 6-8** conjugado con belotecán (círculo gris), el anticuerpo contra TF **TF-ADC 7-8** conjugado con un belotecán (cuadrado), un anticuerpo de isotipo correspondiente conjugado con belotecán (triángulo), MMAE (rombo) o el belotecán libre (círculo negro), en varias líneas de células cancerosas positivas para TF, incluidas RF/6A, A431, HCT-116, BxPC3, AU-565, HPAF-II, MDA-MB-231, AsPC-1, HCC1954 y SKOV-3.

La **FIGURA 6** muestra gráficos de ensayos de citotoxicidad *in vitro* de **FITC-ADC 8** (panel superior, círculo marcado con FITC), **TF-ADC 6-8** (panel superior, cuadrado sin ninguna marca), **TF-ADC 7-8** (panel superior, triángulo), Belotecán (panel superior, cuadrado marcado con B), **FITC-ADC 4** (panel inferior, círculo marcado con FITC), **TF-ADC 6-4** (panel inferior, cuadrado), **TF-ADC 7-4** (panel inferior, triángulo), MMAE (panel inferior, rombo) o Belotecán (panel inferior, círculo marcado con B), en tres líneas celulares de cáncer positivas para TF seleccionadas, que incluyen A431, HPAF-II y BxPC-3.

La **FIGURA 7** muestra gráficos de ensayos de citotoxicidad *in vitro* de **TF-ADC 6-8** que tienen varios niveles de DAR en tres líneas de células cancerosas positivas para TF seleccionadas, incluidas A431, HPAF-II y BxPC-3.

La **FIGURA 8** muestra gráficos de ensayos de citotoxicidad *in vitro* de **TF-ADC 6-4** que tienen diferentes niveles de DAR en tres líneas de células cancerosas positivas para TF seleccionadas, incluidas A431, HPAF-II y BxPC-3.

La **FIGURA 9A** muestra un gráfico del volumen tumoral medio (mm³) frente a días, que indica la eficacia *in vivo* contra un xenoinjerto de BxPC3 de ADC dirigidos a TF. La **FIGURA 9B** muestra los pesos corporales de los ratones evaluados. La **FIGURA 9C** grafica los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 6-8** y **TF-ADC 7-8**. La **FIGURA 9D** grafica los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 7-4**. La **FIGURA 9E** grafica los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 6-8**. La **FIGURA 9F** grafica los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 7-4** y **TF-ADC 7-8**. Se administró una única dosis *i.v.* el Día 0.

La **FIGURA 10A** muestra un gráfico de la **eficacia *in vivo*** contra un xenoinjerto de HPAF-II de ADC dirigidos a TF. La **FIGURA 10B** muestra los pesos corporales de los ratones evaluados. La **FIGURA 10C** representa gráficamente los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 6-8** y **TF-ADC 7-8**. La **FIGURA 10D** representa gráficamente los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 7-4**. La **FIGURA 10E** representa gráficamente los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 6-8**. La **FIGURA 10F** representa gráficamente los datos de eficacia *in vivo* de **TF-ADC 7-4** y **TF-ADC 7-8**. Se administró una única dosis *i.v.* el Día 0.

Las **FIGURAS 11A** y **11B** muestran gráficos de concentraciones del ADC indicado (tADC) y su anticuerpo (tAb) en plasma de ratones dosificados con varios ADC. La **FIGURA 11A** representa gráficamente los datos de ratones a los que se les administraron dosis de 3 mg/kg o 10 mg/kg de **TF-ADC 6-4** o **TF-ADC 6-8**. La **FIGURA 11B** representa gráficamente los datos de ratones a los que se les administraron dosis de 1 mg/kg de **TF-ADC 6-4** o **TF-ADC 6-8**. EXMA-006 sirvió como control negativo en ambos gráficos, mientras que un ADC de referencia sirvió como comparación, tal como se muestra en la **FIGURA 11B**.

Las **FIGURAS 12A** y **12B** muestran gráficos de volúmenes tumorales medidos en ratones con xenoinjerto de HPAF-II tratados con varias dosis de **TF-ADC 6-4** (**FIGURA 12A**) o **TF-ADC 6-8** (**FIGURA 12B**).

Las **FIGURAS 13A** y **13B** proporcionan las concentraciones del ADC indicado (ADC) y su anticuerpo (tAb) en plasma de primates no humanos (NHP) tratados con varias dosis de **TF-ADC 6-4** (**FIGURA 13A**) o **TF-ADC 6-8** (**FIGURA 13B**).

Las **FIGURAS 14A** y **14B** proporcionan concentraciones de carga activa en plasma de NHP tratados con varias dosis de **TF-ADC 6-4** (**FIGURA 14A**) o **TF-ADC 6-8** (**FIGURA 14B**).

Las **FIGURAS 15A-15C** proporcionan resultados ilustrativos de liberación de ATP de células tumorales tratadas (**FIGURAS 15A-15B**, A431; **FIGURA 15C**, SKOV3). Las **FIGURAS 15B-15C** proporcionan áreas bajo la curva (AUC) de células tumorales tratadas con varias concentraciones de **TF-ADC 6-8**, control de isotipo (un anticuerpo de isotipo de IgG1 conjugado con belotecán), o belotecán, mientras que la **FIGURA 15A** representa gráficamente las AUC en los grupos de tratamiento de control (un anticuerpo de isotipo de IgG1 conjugado con belotecán), 33 nM de **TF-ADC 6-8**, 33 nM de belotecán, 100 nM de MMAE o 100 nM de ADC de referencia.

La **FIGURA 16** representa gráficamente la HMGB1 liberada por las células tumorales A431 tratadas con control, 33 nM de **TF-ADC 6-8**, 33 nM de belotecán, 100 nM de MMAE o 100 nM de ADC de referencia.

Las **FIGURAS 17A** y **17B** representan gráficamente el IFN γ liberado por PBMC cocultivadas durante 24 horas (**FIGURA 17A**) o 96 horas (**FIGURA 17B**) con células tumorales pretratadas con ADC de isotipo, **TF-ADC 6-8**, belotecán libre o MMAE libre más un anticuerpo anti-PD-1 (denominado en la presente MMAE + aPD1). Cada barra representa datos de un donante.

Las **FIGURAS 18A** y **18B** representan gráficamente el TNF α liberado por PBMC cocultivadas

durante 24 horas (**FIGURA 18A**) o 96 horas (**FIGURA 18B**) con células yumorales tratadas previamente con ADC de isotipo, **TF-ADC 6-8**, belotecán, o MMAE mas un anticuerpo anti-PD-1 (denominado en la presente MMAE + aPD1). Cada barra representa datos de un donante.

Las FIGURAS 19A y 19B representan gráficamente el IP-10 liberado por PBMC cocultivadas durante 24 horas (**FIGURA 19A**) o 96 horas (**FIGURA 19B**) con células yumorales tratadas previamente con ADC de isotipo, **TF-ADC 6-8**, belotecán, o MMAE mas un anticuerpo anti-PD-1 (denominado en la presente MMAE + aPD1). Cada barra representa datos de un donante.

Las FIGURAS 20A y 20B representan gráficamente el MIP-1 α liberado por PBMC cocultivadas durante 24 horas (**FIGURA 20A**) o 96 horas (**FIGURA 20B**) con células yumorales tratadas previamente con ADC de isotipo, **TF-ADC 6-8**, belotecán, o MMAE mas un anticuerpo anti-PD-1 (denominado en la presente MMAE + aPD1). Cada barra representa datos de un donante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que se unen a TF y un fármaco conjugado (directa o indirectamente) a este. Dichos TF-ADC son útiles en composiciones y métodos para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, un trastorno o una afección mediada por el TF, que incluyen uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección. Las enfermedades, trastornos y afecciones mediadas por TF incluyen una variedad de cánceres, incluidos, de modo no taxativo, cualquier cáncer en donde las células tumorales expresan o sobreexpresan TF. Además, los TF-ADC son útiles para destruir y/o eliminar las células tumorales. Los TF-ADC descritos en la presente son útiles en composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer.

DEFINICIONES

A menos que se indique lo contrario, las siguientes expresiones tienen los siguientes significados. Cualquier término indefinido tiene sus significado reconocido en la técnica.

«Alquilo» hace referencia a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, tal como de 1 a 6 átomos de carbono, o 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3 átomos de carbono. Este término incluye, a modo de ejemplo, grupos hidrocarbilo lineales o ramificados, tales como metilo (CH_3 -), etilo (CH_3CH_2 -), n-propilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), isopropilo ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ -), n-butilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), isobutilo ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ -), sec-butilo ($(\text{CH}_3)(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}$ -), t-butilo ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -), n-pentilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), y neopentilo ($(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2$ -).

La expresión «alquilo sustituido» hace referencia a un grupo alquilo, tal como se define en la presente, en donde uno o más átomos de carbono en la cadena alquilo (excepto el átomo de carbono C_1) fueron remplazados opcionalmente con un heteroátomo tal como O-, N-, S-, $-\text{S}(\text{O})_n$ - (donde n es 0 a 2), $-\text{NR}-$ (donde R es hidrógeno o alquilo) y que tienen 1 a 5 sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo,

carboxialquilo, tioariloxi, tiorheteroariloxi, tiorheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterocicilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxi, amino, nitro, -SO-alquilo, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-arilo, -SO₂-heteroarilo, y -NR^aR^b, en donde R' y R'' pueden ser iguales o diferentes y se eligen de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquino, arilo, heteroarilo y heterocíclico.

«Alqueno» se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos divalentes que preferentemente tienen 1 a 6 y más preferentemente 1 a 3 átomos de carbono que tienen cadena recta o ramificada, y que se interrumpen opcionalmente con uno o más grupos que se seleccionan de O-, -NR¹⁰-, -NR¹⁰C(O)-, -C(O)NR¹⁰- y similares. Este término incluye, a modo de ejemplo, metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-), n-propileno (-CH₂CH₂CH₂-), iso-propileno (-CH₂CH(CH₃)-), (-C(CH₃)₂CH₂CH₂-), (-C(CH₃)₂CH₂C(O)-), (-C(CH₃)₂CH₂C(O)NH-), (-CH(CH₃)CH₂-), y similares.

«Alqueno sustituido» se refiere a un grupo alqueno que tiene de 1 a 3 hidrógenos reemplazados con sustituyentes, tal como se describe para los carbonos en la definición de «sustituido» a continuación.

El término «alcano» se refiere al grupo alquilo y al grupo alqueno, tal como se define en la presente.

Los términos «alquilaminoalquilo», «alquilaminoalqueno» y «alquilaminoalquino» se refieren a los grupos R'NHR'', donde R' es un grupo alquilo, tal como se define en la presente, y R'' es un grupo alqueno, alqueno o alquino, tal como se define en la presente.

El término «alcarilo» o «aralquilo» se refiere a los grupos -alqueno-arilo y -alqueno-arilo sustituido, donde alqueno, alqueno sustituido y arilo se definen en la presente.

«Alcoxi» hace referencia al grupo -O-alquilo, donde alquilo es tal como se define en la presente. Alcoxi incluye, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi, y similares. El término «alcoxi» también se refiere a los grupos alqueno-O-, cicloalquilo-O-, cicloalqueno-O- y alquino-O-, donde alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno y alquino son tal como se definen en la presente.

El término «alcoxi sustituido» hace referencia a los grupos alquilo-O- sustituido, alqueno-O- sustituido, cicloalquilo-O- sustituido, cicloalqueno-O- sustituido, y alquino-O- sustituido, donde alquilo sustituido, alqueno sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno sustituido y alquino sustituido son tal como se definen en la presente.

El término «alcoxi-amino» se refiere al grupo -NH-alcoxi, en donde alcoxi se define en la presente.

El término «haloalcoxi» hace referencia a los grupos alquilo-O-, en donde uno o más átomos de hidrógeno del grupo alquilo se sustituyeron con un grupo halo e incluyen, a modo de ejemplo, grupos tales como trifluorometoxi y similares.

El término «haloalquilo» hace referencia a un grupo alquilo sustituido, tal como se describió anteriormente, en donde uno o más átomos de hidrógeno del grupo alquilo se sustituyeron con un grupo halo. Los ejemplos de dichos grupos incluyen, de modo no taxativo, grupos

fluoroalquilo, tales como trifluorometilo, difluorometilo, trifluoroetilo, y similares.

El término «alquilalcoxi» hace referencia a los grupos -alquileo-O-alquilo, alquileo-O-alquilo sustituido, alquileo sustituido-O-alquilo y alquileo sustituido-O-alquilo sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquileo y alquileo sustituido son tal como se definen en la presente. El término «alquiltioalcoxi» hace referencia al grupo -alquileo-S-alquilo, alquileo-S-alquilo sustituido, alquileo sustituido-S-alquilo y alquileo sustituido-S-alquilo sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquileo y alquileo sustituido son tal como se definen en la presente. «Alqueno» hace referencia a grupos hidrocarbilo de cadena recta o ramificada que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y, preferentemente, 2 a 4 átomos de carbono y que tienen al menos 1 y, preferentemente, 1 a 2 sitios de insaturación de enlace doble. Este término incluye, a modo de ejemplo, bi-vinilo, alilo y but-3-en-1-ilo. Se incluyen en este término los isómeros cis y trans o mezclas de estos isómeros.

El término «alqueno sustituido» se refiere a un grupo alqueno, tal como se define en la presente, que tiene 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxilalquilo, tioariloxi, tiorheteroariloxi, tiorheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tiolacoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxi-amino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo y -SO₂-heteroarilo.

«Alquino» se refiere a grupos hidrocarbilo monovalentes de cadena recta o ramificada que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y, preferentemente, 2 a 3 átomos de carbono y que tienen al menos 1 y, preferentemente, 1 a 2 sitios de insaturación de enlace triple. Los ejemplos de dichos grupos alquino incluyen acetileno (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH).

El término «alquino sustituido» se refiere a un grupo alquino, tal como se define en la presente, que tiene 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxilalquilo, tioariloxi, tiorheteroariloxi, tiorheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tiolacoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxi-amino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo y -SO₂-heteroarilo.

«Alquinoxio» hace referencia al grupo -O-alquino, en donde alquino es tal como se define en la presente. Alquinoxio incluye, a modo de ejemplo, etinoxio, propinoxio, y similares.

«Acilo» se refiere a los grupos HC(O)-, alquilo-C(O)-, alquilo sustituido-C(O)-, alqueno-C(O)-, alqueno sustituido-C(O)-, alquino-C(O)-, alquino sustituido-C(O)-, cicloalquilo-C(O)-,

cicloalquilo sustituido-C(O)-, cicloalquenilo-C(O)-, cicloalquenilo sustituido-C(O)-, arilo-C(O)-, arilo sustituido-C(O)-, heteroarilo-C(O)-, heteroarilo sustituido-C(O)-, heterociclilo-C(O)- y heterociclilo sustituido-C(O)-, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente. Por ejemplo, acilo incluye el grupo «acetilo» $\text{CH}_3\text{C(O)-}$ «Acilamino» hace referencia a los grupos $\text{-NR}^{20}\text{C(O)alquilo}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)alquilo sustituido}$, $\text{NR}^{20}\text{C(O)cicloalquilo}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)cicloalquilo sustituido}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)cicloalquenilo}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)cicloalquenilo sustituido}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)alquenilo}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)alquenilo sustituido}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)alquinilo}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)alquinilo sustituido}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)arilo}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)arilo sustituido}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)heteroarilo}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)heteroarilo sustituido}$, $\text{-NR}^{20}\text{C(O)heterocíclico}$, y $\text{-NR}^{20}\text{C(O)heterocíclico sustituido}$, en donde R^{20} es hidrógeno o alquilo, y en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

«Aminocarbonilo» o el término «aminoacilo» se refiere al grupo $\text{C(O)NR}^{21}\text{R}^{22}$, en donde R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido y donde R^{21} y R^{22} se unen opcionalmente al nitrógeno unido a estos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido, y en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

«Aminocarbonilamino» se refiere al grupo $\text{-NR}^{21}\text{C(O)NR}^{22}\text{R}^{23}$, donde R^{21} , R^{22} y R^{23} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, arilo o cicloalquilo, o donde dos grupos R están unidos para formar un grupo heterociclilo.

El término «alcoxicarbonilamino» hace referencia al grupo -NRC(O)OR , donde cada R es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo o heterociclilo, en donde alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo y heterociclilo son tal como se definen en la presente.

El término «aciloxi» hace referencia a los grupos alquilo-C(O)O-, alquilo sustituido-C(O)O-, cicloalquilo-C(O)O-, cicloalquilo sustituido-C(O)O-, arilo-C(O)O-, heteroarilo-C(O)O- y heterociclilo-C(O)O-, en donde alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, heteroarilo y heterociclilo son tal como se definen en la presente.

«Aminosulfonilo» hace referencia al grupo $-\text{SO}_2\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, en donde R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, y donde R^{21} y R^{22} se unen opcionalmente con el nitrógeno unido a estos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido, y alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

«Sulfonilamino» hace referencia al grupo $-\text{NR}^{21}\text{SO}_2\text{R}^{22}$, en donde R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido, y donde R^{21} y R^{22} se unen opcionalmente a los átomos unidos a estos para formar un grupo heterocíclico o heterocíclico sustituido, y en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

«Arilo» o «Ar» hace referencia a un grupo carbocíclico aromático monovalente de 6 a 18 átomos de carbono que tiene un anillo simple (tal como está presente en un grupo fenilo) o un sistema de anillos que tiene múltiples anillos condensados (ejemplos de dichos sistemas de anillos aromáticos incluyen naftilo, antrilo e indanilo), dichos anillos condensados pueden ser aromáticos o no, siempre que el punto de unión sea a través de un átomo de un anillo aromático. Este término incluye, a modo de ejemplo, fenilo y naftilo. A menos que se limite de otro modo por la definición para el sustituyente de arilo, dichos grupos arilo se pueden sustituir opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes, o 1 o 3 sustituyentes, que se seleccionan de aciloxi, hidroxí, tiol, acilo, alquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo sustituido, alcoxi sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, carboxilalquilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tiorheteroariloxi, $-\text{SO}$ -alquilo, $-\text{SO}$ -alquilo sustituido, $-\text{SO}$ -arilo, $-\text{SO}$ -heteroarilo, $-\text{SO}_2$ -alquilo, $-\text{SO}_2$ -alquilo sustituido, $-\text{SO}_2$ -arilo, $-\text{SO}_2$ -heteroarilo y trihalometilo.

«Ariloxi» hace referencia al grupo $-\text{O}$ -arilo, en donde arilo es tal como se define en la presente, e incluye, a modo de ejemplo, fenoxi, naftoxi, y similares, incluidos grupos arilo opcionalmente sustituidos, como también se define en la presente.

«Amino» se refiere al grupo -NH_2 .

El término «amino sustituido» se refiere al grupo -NRR , donde cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, heteroarilo y heterociclilo, siempre y cuando al menos un R no sea hidrógeno.

El término «azido» hace referencia al grupo -N_3 .

«Carboxilo», «carboxi» o «carboxilato» se refiere a $\text{-CO}_2\text{H}$ o sales de este.

«Carboxil éster» o «carboxi éster» o los términos «carboxialquilo» o «carboxilalquilo» hacen referencia a los grupos -C(O)O-alquilo , $\text{-C(O)O-alquilo sustituido}$, -C(O)O-alquenilo , $\text{-C(O)O-alquenilo sustituido}$, -C(O)O-alquinilo , $\text{-C(O)O-alquinilo sustituido}$, -C(O)O-arilo , $\text{-C(O)O-arilo sustituido}$, $\text{-C(O)O-cicloalquilo}$, $\text{-C(O)O-cicloalquilo sustituido}$, $\text{-C(O)O-cicloalquenilo}$, $\text{-C(O)O-cicloalquenilo sustituido}$, $\text{-C(O)O-heteroarilo}$, $\text{-C(O)O-heteroarilo sustituido}$, $\text{-C(O)O-heterocíclico}$, y $\text{-C(O)O-heterocíclico sustituido}$, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

«(Carboxil éster)oxi» o «carbonato» hacen referencia a los grupos -O-C(O)O-alquilo , $\text{-O-C(O)O-alquilo sustituido}$, $\text{-O-C(O)O-alquenilo}$, $\text{-O-C(O)O-alquenilo sustituido}$, $\text{-O-C(O)O-alquinilo}$, $\text{-O-C(O)O-alquinilo sustituido}$, -O-C(O)O-arilo , $\text{-O-C(O)O-arilo sustituido}$, $\text{-O-C(O)O-cicloalquilo}$, $\text{-O-C(O)O-cicloalquilo sustituido}$, $\text{-O-C(O)O-cicloalquenilo}$, $\text{-O-C(O)O-cicloalquenilo sustituido}$, $\text{-O-C(O)O-heteroarilo}$, $\text{-O-C(O)O-heteroarilo sustituido}$, $\text{-O-C(O)O-heterocíclico}$, y $\text{-O-C(O)O-heterocíclico sustituido}$, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

«Ciano» o «nitrilo» se refiere al grupo -CN .

«Cicloalquilo» se refiere a grupos alquilo cíclicos de 3 a 10 átomos de carbono que tienen anillos cíclicos simples o múltiples, incluidos sistemas de anillos fusionados, con puentes y espiro. Los ejemplos de grupos cicloalquilo adecuados incluyen, por ejemplo, adamantilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo, y similares. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de un solo anillo tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo y similares, o estructuras de anillos múltiples tales como adamantanilo y similares.

El término «cicloalquilo sustituido» hace referencia a grupos cicloalquilo que tienen de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano,

halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxilalquilo, tioariloxi, tiorheteroariloxi, tiorheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tiolacoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxi-amino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo y -SO₂-heteroarilo.

«Cicloalquenilo» hace referencia a grupos alquilo cíclicos no aromáticos de 3 a 10 átomos de carbono que tienen anillos simples o múltiples y al menos un enlace doble y, preferentemente, 1 a 2 enlaces dobles.

El término «cicloalquenilo sustituido» hace referencia a grupos cicloalquenilo que tienen de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, ceto, tioceto, carboxilo, carboxilalquilo, tioariloxi, tiorheteroariloxi, tiorheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tiolacoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxi-amino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo y -SO₂-heteroarilo.

«Cicloalquinilo» hace referencia a grupos cicloalquilo no aromáticos de 5 a 10 átomos de carbono que tienen anillos simples o múltiples y que tienen al menos un enlace triple.

«Cicloalcoxi» se refiere a -O-cicloalquilo.

«Cicloalqueniloxi» se refiere a -O-cicloalquenilo.

«Halo» o «halógeno» se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

«Hidroxi» o «hidroxilo» se refiere al grupo -OH.

«Heteroarilo» hace referencia a un grupo aromático de 1 a 15 átomos de carbono, tal como de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 10 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre dentro del anillo. Dichos grupos heteroarilo pueden tener un solo anillo (tal como, piridinilo, imidazolilo o furilo) o múltiples anillos condensados en un sistema de anillos (por ejemplo, como en grupos tales como indolizínilo, quinolinilo, benzofurano, bencimidazolilo o benzotienilo), en donde al menos un anillo dentro del sistema de anillos es aromático. Para satisfacer los requisitos de valencia, cualquier heteroátomo en dichos anillos heteroarilo puede o no estar unido a H o a un grupo sustituyente, por ejemplo, un grupo alquilo u otro sustituyente tal como se describe en la presente. En determinadas modalidades, el o los átomos del anillo de nitrógeno y/o azufre del grupo heteroarilo se oxidan opcionalmente para proporcionar los restos N-óxido (N→O), sulfinilo o sulfonilo. Este término incluye, a modo de ejemplo, piridinilo, pirrolilo, indolilo, tiofenilo y furanilo. A menos que se limite de otro modo por la definición para el sustituyente de heteroarilo, dichos grupos heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente con 1 a 5 sustituyentes, o 1 o 3 sustituyentes, que se seleccionan de aciloxi, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo sustituido,

alcoxi sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, carboxilalquilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tiorheteroariloxi, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo, y -SO₂-heteroarilo y trihalometilo.

El término «heteroaralquilo» se refiere a los grupos -alquileo-heteroarilo, donde alquileo y heteroarilo se definen en la presente. Este término incluye, a modo de ejemplo, piridilmetilo, piridiletilo, indolilmetilo, y similares.

«Heteroariloxi» se refiere a -O-heteroarilo.

«Heterociclo», «heterocíclico», «heterocicloalquilo» y «heterociclilo» se refieren a un grupo saturado o insaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados, incluidos sistemas de anillos fusionados, con puentes y espiro, y que tiene de 3 a 20 átomos en el anillo, incluidos de 1 a 10 heteroátomos. Estos átomos del anillo se seleccionan de nitrógeno, azufre u oxígeno, donde, en sistemas de anillos fusionados, uno o más de los anillos pueden ser cicloalquilo, arilo o heteroarilo, siempre y cuando el punto de unión sea a través del anillo no aromático. En determinadas modalidades, los uno o más átomos de nitrógeno y/o azufre del grupo heterocíclico se oxidan opcionalmente para proporcionar los restos de N-óxido, -S(O)- o -SO₂-. Para satisfacer los requisitos de valencia, cualquier heteroátomo en dichos anillos heterocíclicos puede o no estar unido a uno o más grupos H o uno o más grupos sustituyentes, por ejemplo, un grupo alquilo u otro sustituyente, tal como se describe en la presente.

Los ejemplos de heterociclos y heteroarilos incluyen, de modo no taxativo, azetidina, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, dihidroindol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, cinnolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, fenoxazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimida, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno, tiazol, tiazolidina, tiofeno, benzo[b]tiofeno, morfolinilo, tiomorfolinilo (también denominado tiamorfolinilo), 1,1-dioxotiomorfolinilo, piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofuranilo y similares.

A menos que se limite de otro modo por la definición para el sustituyente de heterocíclico, dichos grupos heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con 1 a 5, o 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxilalquilo, tioariloxi, tiorheteroariloxi, tiorheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tiolacoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo

sustituido, $-\text{SO}_2$ -arilo y $-\text{SO}_2$ -heteroarilo y heterociclo fusionado.

«Heterociciloxi» se refiere al grupo $-\text{O}$ -heterociclilo.

El término «heterocicilitio» se refiere al grupo heterocíclico-S-.

El término «heterociclenu» se refiere al grupo dirradical formado a partir de un heterociclo, tal como se define en la presente.

El término «hidroxiamino» se refiere al grupo $-\text{NHOH}$.

«Nitro» se refiere al grupo $-\text{NO}_2$.

«Oxo» se refiere al átomo $(=\text{O})$.

«Sulfonilo» se refiere al grupo $-\text{SO}_2$ -alquilo, $-\text{SO}_2$ -alquilo sustituido, $-\text{SO}_2$ -alquenilo, $-\text{SO}_2$ -alquenilo sustituido, $-\text{SO}_2$ -cicloalquilo, $-\text{SO}_2$ -cicloalquilo sustituido, $-\text{SO}_2$ -cicloalquenilo, $-\text{SO}_2$ -cicloalquenilo sustituido, $-\text{SO}_2$ -arilo, $-\text{SO}_2$ -arilo sustituido, $-\text{SO}_2$ -heteroarilo, $-\text{SO}_2$ -heteroarilo sustituido, $-\text{SO}_2$ -heterocíclico, y $-\text{SO}_2$ -heterocíclico sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente. El sulfonilo incluye, a modo de ejemplo, metil- SO_2 -, fenil- SO_2 - y 4-metilfenil- SO_2 -.

«Sulfoniloxi» se refiere al grupo $-\text{OSO}_2$ -alquilo, $-\text{OSO}_2$ -alquilo sustituido, $-\text{OSO}_2$ -alquenilo, $-\text{OSO}_2$ -alquenilo sustituido, $-\text{OSO}_2$ -cicloalquilo, $-\text{OSO}_2$ -cicloalquilo sustituido, $-\text{OSO}_2$ -cicloalquenilo, $-\text{OSO}_2$ -cicloalquenilo sustituido, $-\text{OSO}_2$ -arilo, $-\text{OSO}_2$ -arilo sustituido, $-\text{OSO}_2$ -heteroarilo, $-\text{OSO}_2$ -heteroarilo sustituido, $-\text{OSO}_2$ -heterocíclico, y $-\text{OSO}_2$ -heterocíclico sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

«Sulfato» o «éster de sulfato» hace referencia al grupo $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{OH}$, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -alquilo, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -alquilo sustituido, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -alquenilo, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -alquenilo sustituido, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -cicloalquilo, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -cicloalquilo sustituido, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -cicloalquenilo, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -cicloalquenilo sustituido, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -arilo, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -arilo sustituido, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -heteroarilo, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -heteroarilo sustituido, $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -heterocíclico y $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}$ -heterocíclico sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son tal como se definen en la presente.

El término «aminocarboniloxi» se refiere al grupo $-\text{OC}(\text{O})\text{NRR}$, donde cada R es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, o heterocíclico, en donde alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, y heterocíclico son tal como se definen en la presente.

«Tiol» se refiere al grupo $-\text{SH}$.

«Tioxo» o el término «tioceto» se refiere al átomo (=S).

«Alquiltio» o el término «tioalcoxi» se refiere al grupo -S-alquilo, en donde alquilo es tal como se define en la presente. En determinadas modalidades, el azufre puede oxidarse en -S(O)-. El sulfóxido puede existir como uno o más estereoisómeros.

El término «tioalcoxi sustituido» se refiere al grupo -S-alquilo sustituido.

El término «tioariloxi» hace referencia al grupo arilo-S-, en donde el grupo arilo es tal como se define en la presente, e incluye opcionalmente grupos arilo sustituidos también definidos en la presente.

El término «tioheteroariloxi» hace referencia al grupo heteroarilo-S-, en donde el grupo heteroarilo es tal como se define en la presente, e incluye opcionalmente grupos arilo sustituidos también como se define en la presente.

El término «tioheterociclooxi» hace referencia al grupo heterociclilo-S-, en donde el grupo heterociclilo es tal como se define en la presente, e incluye opcionalmente grupos heterociclilo sustituidos también como se define en la presente.

En la presente descripción, el término «sustituido», cuando se usa para modificar un grupo o radical específico, también puede significar que uno o más átomos de hidrógeno del grupo o radical específico son reemplazados cada uno, independientemente uno del otro, con el mismo grupo de sustituyentes o uno diferente, tal como se define a continuación.

Además de los grupos descritos con respecto a los términos individuales en la presente, los grupos sustituyentes para sustituir uno o más hidrógenos (cualesquiera dos hidrógenos en un solo carbono se pueden reemplazar con =O, =NR⁷⁰, =N-OR⁷⁰, =N₂ o =S) en átomos de carbono saturados en el grupo o radical indicado son, a menos que se indique de otro modo, -R⁶⁰, halo, =O, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -NR⁸⁰R⁸⁰, trihalometilo, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -SO₂R⁷⁰, -SO₂O-M⁺, -SO₂OR⁷⁰, -OSO₂R⁷⁰, -OSO₂O-M⁺, -OSO₂OR⁷⁰, -P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)O-M⁺, -P(O)(OR⁷⁰)₂, -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -C(O)O-M⁺, -C(O)OR⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OC(O)O-M⁺, -OC(O)OR⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰CO₂-M⁺, -NR⁷⁰CO₂R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ y -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, donde R⁶⁰ se selecciona del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo, cada R⁷⁰ es independientemente hidrógeno o R⁶⁰; cada R⁸⁰ es independientemente R⁷⁰ o, alternativamente, dos R⁸⁰, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo de 5, 6 o 7 miembros, que puede incluir opcionalmente de 1 a 4 heteroátomos adicionales iguales o diferentes seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, de los cuales N puede tener una sustitución de -H o alquilo C₁-C₃; y cada M⁺ es un contraión con una carga positiva simple neta. Cada M⁺ puede ser independientemente, por ejemplo, un ion alcalino, tal como K⁺, Na⁺, Li⁺; un ion de amonio, tal

como ${}^+N(R^{60})_4$; o un ion alcalinotérreo, tal como $[Ca^{2+}]_{0,5}$, $[Mg^{2+}]_{0,5}$, o $[Ba^{2+}]_{0,5}$ («el subíndice 0,5 significa que uno de los contraiones para dichos iones alcalinotérreos divalentes puede ser una forma ionizada de un compuesto de la invención y el otro un contraión típico tal como cloruro, o dos compuestos ionizados descritos en la presente pueden servir como contraiones para dichos iones alcalinotérreos divalentes, o un compuesto doblemente ionizado de la invención puede servir como contraión para dichos iones alcalinotérreos divalentes»). Como ejemplos específicos, se pretende que $-NR^{80}R^{80}$ incluya $-NH_2$, $-NH$ -alquilo, N -pirrolidinilo, N -piperazinilo, $4N$ -metil-piperazin-1-ilo y N -morfolinilo.

Además de la descripción en la presente, los grupos de sustituyentes para hidrógenos en átomos de carbono insaturados en grupos alqueno, alquino, arilo y heteroarilo «sustituídos» son, a menos que se indique de otro modo, $-R^{60}$, halo, $-O-M^+$, $-OR^{70}$, $-SR^{70}$, $-S-M^+$, $-NR^{80}R^{80}$, trihalometilo, $-CF_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-NO$, $-NO_2$, $-N_3$, $-SO_2R^{70}$, $-SO_3M^+$, $-SO_3R^{70}$, $-OSO_2R^{70}$, $-OSO_3-M^+$, $-OSO_3R^{70}$, $-PO_3^{-2}(M^+)_2$, $-P(O)(OR^{70})O-M^+$, $-P(O)(OR^{70})_2$, $-C(O)R^{70}$, $-C(S)R^{70}$, $-C(NR^{70})R^{70}$, $-CO_2-M^+$, $-CO_2R^{70}$, $-C(S)OR^{70}$, $-C(O)NR^{80}R^{80}$, $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$, $-OC(O)R^{70}$, $-OC(S)R^{70}$, $-OCO_2-M^+$, $-OCO_2R^{70}$, $-OC(S)OR^{70}$, $-NR^{70}C(O)R^{70}$, $-NR^{70}C(S)R^{70}$, $-NR^{70}CO_2-M^+$, $-NR^{70}CO_2R^{70}$, $-NR^{70}C(S)OR^{70}$, $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$, $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$ y $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$, donde R^{60} , R^{70} , R^{80} y M^+ son tal como se definieron previamente, siempre que, en el caso de alqueno o alquino sustituido, los sustituyentes no sean $-O-M^+$, $-OR^{70}$, $-SR^{70}$, o $-S-M^+$.

Además de los grupos descritos con respecto a los términos individuales de al presente, los grupos de sustituyentes para hidrógenos en átomos de nitrógeno en grupos heteroalquilo y cicloheteroalquilo «sustituídos» son, a menos que se indique de otro modo, $-R^{60}$, $-O-M^+$, $-OR^{70}$, $-SR^{70}$, $-S-M^+$, $-NR^{80}R^{80}$, trihalometilo, $-CF_3$, $-CN$, $-NO$, $-NO_2$, $-S(O)_2R^{70}$, $-S(O)_2O-M^+$, $-S(O)_2OR^{70}$, $-OS(O)_2R^{70}$, $-OS(O)_2O-M^+$, $-OS(O)_2OR^{70}$, $-P(O)(O)_2(M^+)_2$, $-P(O)(OR^{70})O-M^+$, $-P(O)(OR^{70})(OR^{70})$, $-C(O)R^{70}$, $-C(S)R^{70}$, $-C(NR^{70})R^{70}$, $-C(O)OR^{70}$, $-C(S)OR^{70}$, $-C(O)NR^{80}R^{80}$, $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$, $-OC(O)R^{70}$, $-OC(S)R^{70}$, $-OC(O)OR^{70}$, $-OC(S)OR^{70}$, $-NR^{70}C(O)R^{70}$, $-NR^{70}C(S)R^{70}$, $-NR^{70}C(O)OR^{70}$, $-NR^{70}C(S)OR^{70}$, $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$, $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$ y $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$, donde R^{60} , R^{70} , R^{80} y M^+ son tal como se definieron previamente.

Además de la descripción de la presente, en una modalidad determinada, un grupo que está sustituido tiene 1, 2, 3 o 4 sustituyentes, 1, 2 o 3 sustituyentes, 1 o 2 sustituyentes, o 1 sustituyente.

Se entiende que en todos los grupos sustituidos definidos anteriormente, los polímeros a los que se llega definiendo sustituyentes con otros sustituyentes en sí mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido como sustituyente que a su vez está sustituido con un grupo arilo sustituido, que está además sustituido con un grupo arilo sustituido, etc.) no están destinados a ser incluidos en la presente. En dichos casos, la cantidad máxima de sustituciones es tres. Por ejemplo, las sustituciones en serie de grupos arilo sustituidos específicamente

contempladas en la presente se limitan a arilo sustituido-(arilo sustituido)-arilo sustituido.

A menos que se indique lo contrario, la nomenclatura de los sustituyentes que no se definen explícitamente en la presente se obtiene nombrando la parte terminal de la funcionalidad seguida de la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, el sustituyente «arilalquiloxicarbonilo» se refiere al grupo (aril)-(alquil)-OC(O)-.

En cuanto a cualquiera de los grupos descritos en la presente que contienen uno o más sustituyentes, se entiende, por supuesto, que dichos grupos no contienen ninguna sustitución o patrones de sustitución que sean estéricamente imprácticos y/o sintéticamente no factibles. Además, los compuestos de la presente incluyen todos los isómeros estereoquímicos que surgen de la sustitución de estos compuestos.

El término «sal farmacéuticamente aceptable» significa una sal que es aceptable para su administración a un paciente, tal como un mamífero (sales con contraiones que tienen una seguridad aceptable para mamíferos para un régimen de dosificación determinado). Estas sales pueden derivar de bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables y de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. «Sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, que derivan de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo solamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares; y cuando la molécula contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, formiato, tartrato, besilato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares.

El término «sal de este» hace referencia a un compuesto formado cuando un protón de un ácido se reemplaza con un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico y similares. Cuando corresponda, la sal será una sal farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario para sales de compuestos intermedios que no estén destinadas a ser administradas a un paciente. A modo de ejemplo, las sales de estos compuestos incluyen aquellas donde el compuesto está protonado por un ácido inorgánico u orgánico para formar un catión, con el conjugado base del ácido inorgánico u orgánico como el componente aniónico de la sal.

«Solvato» se refiere a un complejo formado por la combinación de moléculas de disolvente con moléculas o iones del soluto. El disolvente puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico o una mezcla de ambos. Algunos ejemplos de disolventes incluyen, de modo no taxativo, metanol, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido y agua. Cuando el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato.

«Estereoisómero» y «estereoisómeros» se refieren a compuestos que tienen la misma conectividad atómica pero diferente disposición atómica en el espacio. Los estereoisómeros incluyen isómeros cis-trans, isómeros *E* y *Z*, enantiómeros y diastereómeros.

«Tautómero» se refiere a formas alternativas de una molécula que difieren solo en el enlace

electrónico de los átomos y/o en la posición de un protón, tal como los tautómeros enol-ceto e imina-enamina, o las formas tautoméricas de grupos heteroarilo que contienen una disposición de átomos de anillo -N=C(H)-NH-, tal como los pirazoles, imidazoles, benzimidazoles, triazoles y tetrazoles. Un experto en la técnica podría reconocer que son posibles otras disposiciones de átomos del anillo tautoméricos.

Se apreciará que el término «o una sal o solvato o estereoisómero de este» pretende incluir todas las permutaciones de sales, solvatos y estereoisómeros, tales como un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable de un estereoisómero del compuesto en cuestión.

«Cantidad farmacéuticamente eficaz» y «cantidad terapéuticamente eficaz» se refieren a una cantidad de un compuesto suficiente para tratar un trastorno o una enfermedad específicos o uno o más de sus síntomas y/o para prevenir la aparición de la enfermedad o el trastorno. En referencia a los trastornos proliferativos tumorigénicos, una cantidad farmacéutica o terapéuticamente eficaz comprende una cantidad suficiente para, entre otras cosas, hacer que el tumor se reduzca o disminuya la tasa de crecimiento del tumor.

«Paciente» se refiere a sujetos humanos y no humanos, especialmente, sujetos mamíferos.

El término «tratar» o «tratamiento», tal como se usa en la presente, significa tratar o el tratamiento de una enfermedad o afección médica en un paciente, tal como un mamífero (particularmente, un ser humano) que incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad o afección médica, tal como, por ejemplo, el tratamiento profiláctico de un sujeto; (b) mejorar la enfermedad o afección médica, tal como, por ejemplo, eliminar o causar la regresión de la enfermedad o afección médica en un paciente; (c) suprimir la enfermedad o afección médica, por ejemplo, retardar o detener el desarrollo de la enfermedad o afección médica en un paciente; o (d) aliviar un síntoma de la enfermedad o afección médica en un paciente.

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína», que se utilizan indistintamente en la presente, hacen referencia a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud. A menos que se indique específicamente lo contrario, «polipéptido», «péptido» y «proteína» pueden incluir aminoácidos genéticamente codificados y no codificados, aminoácidos químicamente o bioquímicamente modificados o derivados, y polipéptidos que tienen estructuras principales peptídicas modificadas. El término incluye proteínas de fusión, incluidas, de modo no taxativo, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líderes heterólogas y homólogas, proteínas que contienen al menos un residuo del extremo N de metionina (por ejemplo, para facilitar la producción en una célula hospedadora recombinante); proteínas marcadas inmunológicamente; y similares. En determinadas modalidades, un polipéptido es un anticuerpo.

«Secuencia de aminoácidos natural» o «secuencia de aminoácidos original» se utilizan indistintamente en la presente para hacer referencia a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido antes de la modificación para incluir al menos un residuo de aminoácidos modificado.

Los términos «análogo de aminoácido», «aminoácido no natural», y similares, pueden usarse indistintamente, e incluyen compuestos similares a los aminoácidos que tienen estructura y/o forma general similar a uno o más aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas naturales (por ejemplo, Ala o A, Cys o C, Asp o D, Glu o E, Phe o F, Gly o G, His o H, Ile o I, Lys o K, Leu o L, Met o M, Asn o N, Pro o P, Gln o Q, Arg o R, Ser o S, Thr o T, Val o V, Trp o W, Tyr o Y). Los análogos de aminoácidos también incluyen aminoácidos naturales con cadenas laterales o estructuras principales modificadas. Los análogos de aminoácido también incluyen análogos de aminoácidos con la misma estereoquímica que en la forma D de origen natural, así como la forma L de análogos de aminoácidos. En algunos casos, los análogos de aminoácidos comparten las estructuras de estructura principal, y/o las estructuras de cadena lateral de uno o más aminoácidos naturales, donde la diferencia es uno o más grupos modificados en la molécula. Dicha modificación puede incluir, de modo no taxativo, la sustitución de un átomo (tal como N) por un átomo relacionado (tal como S), la adición de un grupo (tal como metilo, o hidroxilo, etc.) o un átomo (tal como Cl o Br, etc.), eliminación de un grupo, sustitución de un enlace covalente (enlace simple por enlace doble, etc.), o combinaciones de estos. Por ejemplo, los análogos de aminoácidos pueden incluir α -hidroxiácidos, y α -aminoácidos, y similares. Los ejemplos de análogos de aminoácidos incluyen, de modo no taxativo, sulfoalanina y similares.

Los términos «cadena lateral de aminoácido» o «cadena lateral de un aminoácido», y similares, pueden usarse para referirse al sustituyente unido al α -carbono de un residuo de aminoácido, lo que incluye aminoácidos naturales, aminoácidos antinaturales y análogos de aminoácidos. Una cadena lateral de aminoácidos también puede incluir una cadena lateral de aminoácidos tal como se describe en el contexto de los aminoácidos modificados y/o conjugados descritos en la presente.

El término «carbohidrato» y similares pueden usarse para referirse a unidades de monómeros y/o polímeros de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. El término azúcar se puede utilizar para referirse a los carbohidratos más pequeños, tales como monosacáridos, disacáridos. El término «derivado de carbohidratos» incluye compuestos en los que uno o más grupos funcionales de un carbohidrato de interés están sustituidos (reemplazados con cualquier sustituyente conveniente), modificados (convertidos en otro grupo mediante el uso de cualquier química conveniente) o ausentes (por ejemplo, eliminados o reemplazados con H). Una variedad de carbohidratos y derivados de carbohidratos están disponibles y pueden adaptarse para su uso en los compuestos y conjugados en cuestión.

El término «glicósido» o «glicosilo» se refiere a una molécula o grupo de azúcar unido a un resto a través de un enlace glicosídico. Por ejemplo, el resto al que está unido el glicósido puede ser un enlazador escindible, tal como se describe en la presente. Un enlace glicosídico puede enlazar el glicósido al otro resto a través de varios tipos de enlaces, tales como, de modo no taxativo, un enlace O-glicosídico (un O-glicósido), un enlace N-glicosídico (una glicosilamina), un enlace S-

glicosídico (un tioglicósido) o un enlace C-glicosídico (un C-glicósido o C-glicosilo). En algunos casos, los glicósidos pueden separarse del resto al que están unidos, tal como por hidrólisis mediada químicamente o hidrólisis mediada enzimáticamente.

El término «anticuerpo» se usa en la presente en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab) y similares. Un anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno diana. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5.^a Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana puede tener uno o más sitios de unión, también llamados epítomos, reconocidos por regiones determinantes de la complementariedad (CDR) formadas por una o más regiones variables de un anticuerpo.

La expresión «anticuerpo natural» se refiere a un anticuerpo en el cual las cadenas pesada y ligera del anticuerpo fueron preparadas y emparejadas por el sistema inmunitario de un organismo multicelular. El bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea y el suero son ejemplos de tejidos que producen anticuerpos naturales. Por ejemplo, los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos aisladas de un primer animal inmunizado con un antígeno son anticuerpos naturales.

El término «anticuerpo humanizado» o «inmunoglobulina humanizada» se refiere a un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón o conejo) que contiene uno o más aminoácidos (en una región marco, una región constante o una CDR, por ejemplo) que ha sido sustituido por un aminoácido posicionado de manera correspondiente de un anticuerpo humano. En general, los anticuerpos humanizados producen una respuesta inmunitaria reducida en un hospedador humano, en comparación con una versión no humanizada del mismo anticuerpo. Los anticuerpos pueden humanizarse mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación de PCT WO 91/09967; patentes estadounidenses n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento y restauración (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994)), y transposición de cadena (patente estadounidense n.º 5.565.332). En determinadas modalidades, las sustituciones del marco se identifican mediante el modelado de las interacciones de los residuos de marco y CDR para identificar los residuos de marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los residuos de marco inusuales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.585.089; Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988)). Se describen métodos adicionales para humanizar anticuerpos contemplados para su uso en la presente invención en las patentes estadounidenses n.º 5.750.078; 5.502.167; 5.705.154; 5.770.403; 5.698.417; 5.693.493; 5.558.864; 4.935.496; y

4.816.567, y en las publicaciones PCT WO 98/45331 y WO 98/45332. En modalidades particulares, un anticuerpo de conejo de la presente puede humanizarse de acuerdo con los métodos establecidos en US20040086979 y US20050033031. En consecuencia, los anticuerpos descritos anteriormente pueden humanizarse mediante el uso de métodos que son conocidos en la técnica

La expresión «anticuerpos quiméricos» se refiere a anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se construyeron, típicamente mediante ingeniería genética, a partir de genes de regiones variables y constantes de anticuerpos pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como gamma 1 y gamma 3. Un ejemplo de anticuerpo quimérico terapéutico es una proteína híbrida compuesta por el dominio variable o de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano, aunque se pueden utilizar dominios de otras especies de mamíferos.

Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina de polipéptido inmunoglobulina se compone de una región de «marco» (FR) interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas «regiones determinantes de la complementariedad» o «CDR». Se ha definido la extensión de la región marco y las CDR (véase «Sequences of Proteins of Immunological Interest», E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión de un antígeno a un epítipo.

Un «polipéptido Ig original» es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que carece de una región constante marcada con aldehído, tal como se describe en la presente. El polipéptido original puede comprender una región constante de secuencia natural, o puede comprender una región constante con modificaciones de secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, eliminaciones y/o sustituciones).

Tal como se usa en la presente, el término «aislado/a» se refiere a describir un compuesto de interés que está en un ambiente diferente de aquél donde aparece naturalmente el compuesto. «Aislado/a» pretende incluir compuestos que se encuentran dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas con el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés está parcial o sustancialmente purificado.

Tal como se usa en la presente, el término «sustancialmente purificado» se refiere a un compuesto que se elimina de su entorno natural y está al menos 60 % libre, al menos 75 % libre, al menos 80 % libre, al menos 85 % libre, al menos 90 % libre, al menos 95 % libre, al menos 98 % libre o más de 98 % libre de otros componentes con los que está asociado de forma natural. El término «condiciones fisiológicas» pretende abarcar aquellas condiciones compatibles con las células vivas, por ejemplo, condiciones predominantemente acuosas de temperatura, pH,

salinidad, *etc.* que sean compatibles con las células vivas.

Por «compañero reactivo» se entiende una molécula o resto molecular que reacciona específicamente con otro compañero reactivo para producir un producto de reacción. Los compañeros reactivos ilustrativos incluyen una cisteína o serina de un motivo sulfatasa y una enzima generadora de formilglicina (FGE), que reaccionan para formar un producto de reacción de una etiqueta de aldehído convertida que contiene una formilglicina (fGly) en lugar de cisteína o serina en el motivo. Otros compañeros reactivos ilustrativos incluyen un aldehído de un residuo de fGly de una etiqueta de aldehído convertida (por ejemplo, un grupo de aldehído reactivo) y un «compañero reactivo que reacciona al aldehído», que comprende un grupo reactivo al aldehído y un resto de interés, y que reacciona para formar un producto de reacción de un polipéptido que tiene el resto de interés conjugado con el polipéptido a través de un residuo de fGly.

«Extremo N» se refiere al residuo de aminoácido terminal de un polipéptido que tiene un grupo amina libre, donde el grupo amina en los residuos de aminoácido que no son del extremo N normalmente forma parte de la estructura principal covalente del polipéptido.

«Extremo C» se refiere al residuo de aminoácido terminal de un polipéptido que tiene un grupo carboxilo libre, donde el grupo carboxilo en los residuos de aminoácido que no son del extremo C normalmente forma parte de la estructura principal covalente del polipéptido.

Por «sitio interno», tal como se usa en referencia a un polipéptido o una secuencia de aminoácidos de un polipéptido, significa una región del polipéptido que no está en el extremo N ni en el extremo C.

El término «sujeto» se refiere a sujetos humanos y no humanos, especialmente, a sujetos mamíferos.

El término «tratar» o «tratamiento», tal como se usa en la presente, significa tratar o el tratamiento de una enfermedad o afección médica en un sujeto, tal como un mamífero (particularmente, un ser humano) que incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad o afección médica, tal como, por ejemplo, el tratamiento profiláctico de un sujeto; (b) mejorar la enfermedad o afección médica, tal como, por ejemplo, eliminar o causar la regresión de la enfermedad o afección médica en un sujeto; (c) suprimir la enfermedad o afección médica, por ejemplo, retardar o detener el desarrollo de la enfermedad o afección médica en un sujeto; o (d) aliviar un síntoma de la enfermedad o afección médica en un sujeto. En algunas modalidades, el término «tratar» o «tratamiento» excluye un tratamiento profiláctico.

El término «secuencia de aminoácidos natural», tal como se usa en la presente, se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido antes de la modificación para incluir un residuo de aminoácido modificado.

Los términos «análogo de aminoácido», «aminoácido no natural», y similares, se usan indistintamente, e incluyen compuestos similares a los aminoácidos que tienen estructura y/o forma general similar a uno o más aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas

naturales (por ejemplo, Ala o A, Cys o C, Asp o D, Glu o E, Phe o F, Gly o G, His o H, Ile o I, Lys o K, Leu o L, Met o M, Asn o N, Pro o P, Gln o Q, Arg o R, Ser o S, Thr o T, Val o V, Trp o W, Tyr o Y). Los análogos de aminoácidos también incluyen aminoácidos naturales con cadenas laterales o estructuras principales modificadas. Los análogos de aminoácido también incluyen análogos de aminoácidos con la misma estereoquímica que en la forma D de origen natural, así como la forma L de análogos de aminoácidos. En algunas modalidades, los análogos de aminoácidos comparten las estructuras de estructura principal, y/o las estructuras de cadena lateral de uno o más aminoácidos naturales, donde la diferencia es uno o más grupos modificados en la molécula. Dicha modificación puede incluir, de modo no taxativo, la sustitución de un átomo (tal como N) por un átomo relacionado (tal como S), la adición de un grupo (tal como metilo o hidroxilo, y similares) o un átomo (tal como Cl o Br, y similares), eliminación de un grupo, sustitución de un enlace covalente (enlace simple por enlace doble, y similares), o combinaciones de estos. Por ejemplo, los análogos de aminoácidos pueden incluir α -hidroxiácidos, y α -aminoácidos, y similares.

El término «cadena lateral de aminoácido» se usa para hacer referencia al sustituyente unido al α -carbono de un residuo de aminoácido, lo que incluye aminoácidos naturales, aminoácidos antinaturales y análogos de aminoácidos. Una cadena lateral de aminoácidos también puede incluir una cadena lateral de aminoácidos tal como se describe en el contexto de los aminoácidos modificados y/o conjugados descritos en la presente.

El término «carbohidrato» se usa para hacer referencia a unidades de monómeros y/o polímeros de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. El término azúcar se usa para hacer referencia a los carbohidratos más pequeños, tales como monosacáridos, disacáridos. El término «derivado de carbohidratos» incluye compuestos en los que uno o más grupos funcionales de un carbohidrato de interés están sustituidos (reemplazados con cualquier sustituyente conveniente), modificados (convertidos en otro grupo mediante el uso de cualquier química conveniente) o ausentes (por ejemplo, eliminados o reemplazados con H). Una variedad de carbohidratos y derivados de carbohidratos están disponibles y pueden adaptarse para su uso en los compuestos y conjugados en cuestión.

El término «glicósido» o «glicosilo» se refiere a una molécula o grupo de azúcar unido a un resto a través de un enlace glicosídico. Por ejemplo, el resto al que está unido el glicósido puede ser un enlazador escindible, tal como se describe en la presente. Un enlace glicosídico puede enlazar el glicósido al otro resto a través de varios tipos de enlaces, tales como, de modo no taxativo, un enlace O-glicosídico (un O-glicósido), un enlace N-glicosídico (una glicosilamina), un enlace S-glicosídico (un tioglicósido) o un enlace C-glicosídico (un C-glicósido o C-glicosilo). En algunos casos, los glicósidos pueden separarse del resto al que están unidos, tal como por hidrólisis mediada químicamente o hidrólisis mediada enzimáticamente.

Los términos «factor tisular», «TF», «factor tisular plaquetario», «factor III», «tromboplastina» y

«CD142» se usan indistintamente en la presente para hacer referencia a TF, o cualquier variante (por ejemplo, variantes de empalme y variantes alélicas), isoformas y homólogos de especies de TF que se expresan naturalmente por las células, o que se expresan por células transfectadas con un gen de TF. En algunos aspectos, la proteína TF es una proteína TF expresada naturalmente por un primate (por ejemplo, un mono o un ser humano), un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), un perro, un camello, un gato, una vaca, una cabra, un caballo, un cerdo o una oveja. El término TF abarca el TF de «longitud completa», así como cualquier forma de TF o cualquier fragmento de este, por ejemplo, aquellos resultantes del procesamiento en una célula. En algunas modalidades, el TF comprende una secuencia señal. En algunas modalidades, el TF no incluye una secuencia señal. En algunas modalidades, el término TF se refiere a un fragmento del TF de longitud completa, que comprende un dominio extracelular de TF (ECD). El término TF también abarca variantes naturales de TF, como variantes de SNP, variantes de empalme y variantes alélicas. En algunos aspectos, la proteína TF es TF humano (hTF; METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV NQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPL YENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYY WKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREI FYIIGAVVFVVIILVILAILSLHKCRKAGVGQSWKENSPLNVS (SEQ ID NO:175), en donde el subrayado indica el péptido señal). En otras modalidades, el TF humano no comprende un péptido señal, por ejemplo, el aminoácido (aa) 33 a aa 295 de la SEQ ID NO:175. En otras modalidades adicionales, el TF humano, tal como se usa en la presente, se refiere al dominio extracelular (ECD) del TF humano, por ejemplo, aa 33 a aa 251 de la SEQ ID NO:175. En algunos aspectos, la proteína TF es TF de cynomolgus (cTF; SGGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPINQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTADTECDLTDEIV KDVKQTYLARVFSYPAGHVESTGSTEEPYPYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTV QDEWTLVRRNDTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQ AVIPSRRRTANRKSTDSPVECMGHEKGESREIFYIIGAVVFVVIILVILAILSLHKCKKARVGRSWKE NSPLNVA (SEQ ID NO:176)). En modalidades adicionales, el TF de cynomolgus, tal como se usa en la presente, se refiere a su ECD, por ejemplo, aa 1 a aa 220 de la SEQ ID NO:176. En algunos aspectos, la proteína TF es TF de ratón (mTF; AGIPEKAFNLTWISTDFKTILEWQPKPTNYTYTVQISDRSRNWKNKCFSTTDTECDLTDEIVKDV TWAYEAKVLSVPRRNSVHGDGDQLVIHGEEPPFTNAPKFLPYRDTNLGQPVIQQFEQDGRKLN VVKDSLTLVRKNGTFLTLRQVFGKDLGYIITYRKGSSTGKKTNTNTNEFSIDVEEGVSYCFFV QAMIFSRKTNQNSPGSSTVCTEQWKSFLGETLIIVGAVLLATIFIILLSISLCKRRKNRAGQKGK NTPSRLA (SEQ ID NO:177)). En modalidades adicionales, el TF de ratón, tal como se usa en la presente, se refiere a su ECD, por ejemplo, aa 1 a aa 223 de la SEQ ID NO:177. En algunos aspectos, la proteína TF es TF de cerdo (pTF;

TGTTDVIVAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPINYVYTVQISPLRGDWKNKCFHTTDECDVTDEIMR
 NVKETYVARVLSYPADTVLTAQEPPFTNSPPFTPYLDTNLGQPVIQSFEQVGTKLNVTVEAART
 LVRVNGTFLRLRDVFGKDLNYTLYYWRASSTGKKKATTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR
 RVNQKSPESTRIECTSQEKAVSRELFIVGAVVFAVIVFVLVLSVSLYKCRKERAGPSGKENAPLN
 VA (SEQ ID NO:178)). En algunas modalidades, el TF de cerdo, tal como se usa en la presente, se refiere a su ECD, por ejemplo, aa a aa 216 de la SEQ ID NO:178. El TF es un receptor de la superficie celular para el factor de serina proteasa VIIa. A menudo, se expresa de forma constitutiva en ciertas células que rodean los vasos sanguíneos y en algunos entornos patológicos.

En algunas modalidades, el término TF, tal como se usa en la presente, se refiere a un epítipo de TF.

Los términos «anticuerpo», «inmunoglobulina» o «Ig» se usan indistintamente en la presente y se usan en el sentido más amplio y cubren, específicamente, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (incluidos agonistas, antagonistas, anticuerpos neutralizantes, anticuerpos monoclonales de longitud completa), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica o monoepitópica, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos de dominio único, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (incluidos anticuerpos biespecíficos), anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o versiones humanas de anticuerpos que tienen cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa. Los anticuerpos también incluyen dominios de anticuerpos individuales, así como fragmentos de anticuerpos (y/o polipéptidos que comprenden fragmentos de anticuerpos) que conservan características de unión de TF. Los ejemplos no taxativos de fragmentos de anticuerpos incluyen regiones de unión al antígeno y/o regiones efectoras del anticuerpo, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, (scFv)₂, molécula de anticuerpo de cadena simple, anticuerpo de dominio variable dual, anticuerpo de dominio variable único, anticuerpo lineal, región V, un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpo, F(ab)₂, Fd, Fc, diacuerpo, di-diacuerpo, Fv unidos por disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (por ejemplo, nanocuerpo) u otros fragmentos (por ejemplo, fragmentos que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera que están acopladas de forma no covalente). En términos generales, una región variable (V) puede ser cualquier disposición adecuada de regiones variables pesadas (VH) y/o ligeras (VL) de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos también incluyen anticuerpos tetaméricos que comprenden dos moléculas de cadena pesada y dos de cadena ligera, un monómero de cadena ligera de anticuerpo y un monómero de cadena pesada de anticuerpo. Por lo tanto, por ejemplo, la región V puede ser dimérica y contener dímeros VH-VH, VH-VL o VL-VL que se unen a TF. En cualquier modalidad, una región VH y una región VL se pueden acoplar covalentemente ya sea directamente o a través de un enlazador para formar un Fv de cadena simple (scFv). Para facilitar la referencia, en la

presente se hace referencia a las proteínas scFv como incluidas en la categoría «fragmentos de anticuerpos». Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo. Las CDR (también denominadas «unidades de reconocimiento mínimo» o «regiones hipervariables») pueden obtenerse mediante la construcción de polinucleótidos que codifican una o más CDR de interés. Dichos polinucleótidos se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable mediante el uso de ARNm de células productoras de anticuerpos como plantilla (véase, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:106 (1991); Courtenay-Luck, «Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies», en *Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166, Cambridge University Press (1995); y Ward et al., «Genetic Manipulation and Expression of Antibodies», en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)). Los fragmentos de anticuerpos se pueden incorporar, por ejemplo, en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, regiones variables de nuevos receptores de antígenos (v-NAR) y regiones Fv de cadena simple bis (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 23(9):1126-1136, 2005). En algunas modalidades, los anticuerpos que comprenden una VH y/o VL contienen una región constante de cadena ligera y/o de cadena pesada, tal como una o más regiones constantes, incluidas una o más regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden incluir fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o cualquier subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de molécula de inmunoglobulina.

El término «monoespecífico», tal como se usa en la presente, indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítomo del mismo antígeno.

El término «biespecífico» significa que el anticuerpo puede unirse específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos, por ejemplo, dos sitios de unión, cada uno formado por un par de una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que se unen a diferentes antígenos o a diferentes epítomos en el mismo antígeno. Un anticuerpo biespecífico de este tipo puede tener un formato 1+1 (que comprende un sitio de unión para un primer antígeno o epítomo y un sitio de unión para un segundo antígeno o epítomo). Otros formatos de anticuerpos biespecíficos pueden ser formatos 2+1 o 1+2 (que comprenden dos sitios de unión para un primer antígeno o epítomo y un sitio de unión para un segundo antígeno o epítomo) o formato 2+2 (que comprende dos sitios de unión para un primer antígeno o epítomo y dos sitios de unión para un segundo antígeno o epítomo). Cuando un anticuerpo biespecífico comprende dos sitios de unión al antígeno, cada uno puede unirse a un determinante antigénico diferente. Un anticuerpo biespecífico de este tipo puede

unirse a dos epítomos diferentes en el mismo antígeno (por ejemplo, epítomos en TF).

En el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, «idéntico» o porcentaje de «identidad» hacen referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o de residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean (con la introducción de huecos, si fuera necesario) para una máxima correspondencia, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse mediante el uso de software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En la técnica se conocen diversos algoritmos y software que pueden usarse para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Estos incluyen, de modo no taxativo, una herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST), ALIGN, MegAlign, BestFit, GCG Wisconsin Package y variantes de estos. En algunas modalidades, dos ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, o al menos 90 % y, en algunas modalidades, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de nucleótidos o de residuos de aminoácidos cuando se comparan y se alinean para una máxima correspondencia, tal como se miden mediante el uso de un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En algunas modalidades, existe identidad en una región de las secuencias de aminoácidos que tiene al menos alrededor de diez residuos, al menos alrededor de 20 residuos, al menos alrededor de 40-60 residuos, al menos alrededor de 60-80 residuos de longitud o cualquier valor entero intermedio. En algunas modalidades, existe identidad en una región más larga que 60-80 residuos, tal como al menos alrededor de 80-100 residuos, y en algunas modalidades, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, tal como la región codificante de una proteína diana o un anticuerpo. En algunas modalidades, existe identidad en una región de las secuencias de nucleótidos que tiene al menos alrededor de diez bases, al menos alrededor de 20 bases, al menos alrededor de 40-60 bases, al menos alrededor de 60-80 bases de longitud o cualquier valor entero intermedio. En algunas modalidades, existe identidad en una región más larga que 60-80 bases, tal como al menos alrededor de 80-1000 bases o más, y en algunas modalidades, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, tal como una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés.

Una «sustitución conservadora de aminoácidos» es una sustitución en la cual el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral con características químicas similares. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido generalmente en la técnica, e incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina,

valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución una fenilalanina con una tirosina es una sustitución conservadora. Generalmente, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos, proteínas solubles y/o anticuerpos de la descripción no anulan la unión del polipéptido, la proteína soluble o el anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos al sitio de unión diana. Se conocen en la técnica métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la unión.

El término «polipéptido» se refiere a un polímero de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede incluir (por ejemplo, estar sustituido con) no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como enlace o conjugación (directa o indirecta) con un resto tal como un componente de marcado o un fármaco (por ejemplo, toxina). También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta descripción pueden basarse en anticuerpos u otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, en algunas modalidades, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o dímeros de cadenas simples.

Tal como se utiliza en la presente, un «antígeno» es un resto o molécula que contiene un epítipo al que puede unirse un anticuerpo. De esta forma, un antígeno puede unirse a un anticuerpo. En algunas modalidades, el antígeno al que se une un anticuerpo descrito en la presente es TF (por ejemplo, TF humano), o un fragmento de este, tal como un fragmento que comprende una o más regiones de TF.

Tal como se usa en la presente, un «epítipo» es un término en la técnica y hace referencia a una región localizada de un antígeno, a la cual puede unirse un anticuerpo. Un epítipo puede ser un epítipo lineal o un epítipo conformacional, no lineal o discontinuo. En el caso de un antígeno polipeptídico, por ejemplo, un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido (un epítipo «lineal») o un epítipo puede comprender aminoácidos de dos o más regiones no contiguas del polipéptido (un epítipo «conformacional», «no lineal» o «discontinuo»), por ejemplo, TF humano. Un experto en la técnica apreciará que, en general, un epítipo lineal puede o no depender de una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria. Por ejemplo, en algunas modalidades, un anticuerpo se une a un grupo de aminoácidos independientemente de si están plegados en una estructura proteica tridimensional natural. En otras modalidades, un anticuerpo requiere que los residuos de aminoácidos que forman el epítipo muestren una conformación

particular (por ejemplo, curvatura, torsión, giro o pliegue) para reconocer y unirse al epítopo.

Un anticuerpo se une a «un epítopo», «esencialmente el mismo epítopo» o «el mismo epítopo» que un anticuerpo de referencia. Los métodos más utilizados y rápidos para determinar si dos anticuerpos se unen a epítomos idénticos, superpuestos o adyacentes en un espacio tridimensional son los ensayos de competencia, que pueden configurarse en varios formatos diferentes, por ejemplo, mediante el uso de un antígeno marcado o anticuerpo marcado. En algunos ensayos, el antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pocillos o se expresa en una superficie celular, y la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de los anticuerpos marcados se mide mediante el uso de marcadores radiactivos, fluorescentes o enzimáticos.

La «clasificación de epítomos» es el proceso de agrupar los anticuerpos en función de los epítomos que reconocen. Más particularmente, la agrupación de epítomos comprende métodos y sistemas para discriminar las propiedades de reconocimiento de epítomos de diferentes anticuerpos, utilizando ensayos de competencia combinados con procesos computacionales para agrupar anticuerpos en función de sus propiedades de reconocimiento de epítomos e identificar anticuerpos que tienen especificidades de unión distintas. En la presente se describen detalles adicionales sobre los métodos para agrupar epítomos y determinar la unión a epítomos de anticuerpos, tal como se muestra en el Ejemplo 5.

Tal como se usan en la presente, los términos «se une específicamente», «reconoce específicamente», «se une inmunoespecíficamente», «se une selectivamente», «reconoce inmunoespecíficamente» e «inmunoespecífico» son términos análogos en el contexto de los anticuerpos y se refieren a moléculas que se unen a un antígeno (por ejemplo, epítopo), tal como lo entiende un experto en la técnica.

En algunas modalidades, «se une específicamente» significa, por ejemplo, que un polipéptido o molécula interactúa con mayor frecuencia, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de los anteriores con el epítopo, la proteína o la molécula diana que con sustancias alternativas, incluidas proteínas relacionadas y no relacionadas. Por ejemplo, una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos, generalmente, con menor afinidad, según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIACORE™, instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), el sistema OctetQK384 (ForteBio, Menlo Park, CA), u otros ensayos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, un anticuerpo o una región de unión al antígeno se une o se une específicamente a un antígeno cuando se une al antígeno con mayor afinidad que a cualquier antígeno reactivo cruzado, según se determina mediante el uso de técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal o ruido de fondo y puede ser más de diez veces el fondo. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology

332-36 (Paul ed., 2.^a ed. 1989) para un análisis sobre la especificidad de unión. En algunas modalidades, el grado de unión de un anticuerpo o una región de unión al antígeno a una proteína «no diana» es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo o la región de unión al antígeno a su antígeno diana, por ejemplo, según se determina mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o RIA. En algunas modalidades, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno se unen al antígeno con una K_A que es al menos 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 4 logs o mayor que la K_A cuando las moléculas se unen a otro antígeno. En algunas modalidades, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otras proteínas. En otra modalidad específica, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otras proteínas que no son de TF. En algunas modalidades, «se une específicamente» significa, por ejemplo, que un polipéptido o una molécula se une a una proteína o diana con una K_D de alrededor de 0,1 mM o menos, pero más habitualmente menos de alrededor de 1 μ M. En algunas modalidades, «se une específicamente» significa que un polipéptido o molécula se une a una diana con una K_D de al menos alrededor de 0,1 μ M o menos, al menos alrededor de 0,01 μ M o menos, o al menos alrededor de 1 nM o menos. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un polipéptido o molécula que reconoce una proteína o una diana en más de una especie. Asimismo, debido a la homología dentro de ciertas regiones de secuencias polipeptídicas de diferentes proteínas, la unión específica puede incluir un polipéptido o molécula que reconoce más de una proteína o diana. Se entiende que, en algunas modalidades, un polipéptido o molécula que se une específicamente a un primera diana puede o no unirse específicamente a una segunda diana. Como tal, la «unión específica» no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva, por ejemplo, la unión a una única diana. Por lo tanto, en algunas modalidades, un polipéptido o una molécula puede unirse específicamente a más de una diana. En algunas modalidades, múltiples objetivos pueden unirse mediante el mismo sitio de unión al antígeno en el polipéptido o molécula. Por ejemplo, en algunas modalidades, un anticuerpo puede comprender dos sitios de unión a antígeno idénticos, cada uno de los cuales se une específicamente al mismo epítipo en dos o más proteínas. En modalidades alternativas, un anticuerpo puede ser biespecífico y comprender al menos dos sitios de unión al antígeno con diferentes especificidades. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a «unión» significa «unión específica».

El término «afinidad de unión» generalmente hace referencia a la resistencia de la suma de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno tal como TF). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, «afinidad de unión» hace referencia a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula de unión X por su compañero

de unión Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse mediante el uso de métodos habituales conocidos en la técnica, incluidos los que se describen en la presente. Los anticuerpos de baja afinidad por lo general se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad por lo general se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Se conoce en la técnica una variedad de métodos para medir la afinidad de unión y es posible utilizar cualquiera de ellos a los efectos de la presente descripción. En una modalidad, el « K_D » o «valor K_D » se puede medir mediante interferometría de biocapa (BLI), por ejemplo, mediante el uso del sistema OctetQK384 (ForteBio, Menlo Park, CA). Alternativamente, la K_D también puede medirse en un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA), por ejemplo, realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno (Chen et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881) o mediante el uso de ensayos de resonancia de plasmones superficiales (SPR) de BIACORE™, por ejemplo, mediante el uso de un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Una «tasa de activación» o «tasa de asociación» o «tasa de asociación» o « k_{on} », así como una «tasa de desactivación» o «tasa de disociación» o «tasa de disociación» o « k_{off} », también se pueden determinar con las mismas técnicas SPR o BLI descritas en la presente, por ejemplo, mediante el uso del sistema OctetQK384 (ForteBio, Menlo Park, CA) o un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIACORE™, Inc., Piscataway, NJ), respectivamente.

El término «competir», cuando se usa en el contexto de un anticuerpo contra TF, describe un agente de unión que, en presencia de otro agente de unión, tiene al menos parcialmente inhibida su unión a un epítipo o sitio de unión debido a la unión del otro agente de unión. La competencia puede determinarse mediante un ensayo en el que el agente de unión en estudio previene o inhibe la unión específica de una molécula de referencia (por ejemplo, un ligando de referencia o una proteína de unión al antígeno de referencia, tal como un anticuerpo de referencia) a un antígeno común (por ejemplo, TF). Se pueden utilizar numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si un agente de unión de prueba compete con una molécula de referencia para unirse a TF (por ejemplo, TF humano). Los ejemplos de ensayos que pueden emplearse incluyen radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA); inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición tipo sándwich (véase, por ejemplo, Stahli et al., (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (véase, por ejemplo, Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619 o Cheung, et al., (1990) *Virology* 176:546-552); ensayo marcado directo en fase sólida; ensayo tipo sándwich marcado directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA de marcado directo en fase sólida utilizando marcado I-125 (véase, por ejemplo, Morel et al., (1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15); y RIA marcado directamente (Moldenhauer et al., (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77-82).

Normalmente, un ensayo de este tipo implica el uso de un antígeno purificado (por ejemplo, TF, tal como TF humano) unido a una superficie sólida o células que llevan una proteína de unión al antígeno de prueba no marcada (por ejemplo, anticuerpo contra TF de prueba o ADC) o una proteína de unión al antígeno de referencia marcada (por ejemplo, anticuerpo contra TF de referencia o ADC). La inhibición competitiva puede medirse determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la proteína de unión al antígeno de prueba. Generalmente, la proteína de unión al antígeno de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante ensayo de competencia (anticuerpos en competencia) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y/o anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo unido a la referencia para que se produzca un impedimento estérico de los anticuerpos (por ejemplo, epítipo similar o epítipo superpuesto). Generalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 20 %, por ejemplo, al menos 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En algunas modalidades, la unión se inhibe en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.

Los términos «región constante» y «dominio constante» se utilizan indistintamente en la presente, son términos de la técnica de anticuerpos bien conocidos y se refieren a una parte de anticuerpo, por ejemplo, una parte del extremo carboxilo de una cadena ligera y/o pesada que no está directamente involucrada en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero que puede presentar varias funciones efectoras, tal como la interacción con un receptor de Fc. El término incluye la parte de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos generalmente más conservada con respecto a una región variable de inmunoglobulina.

Las «funciones efectoras» del anticuerpo hacen referencia a las actividades biológicas que se pueden atribuir a la región Fc (por ejemplo, una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y que varían según el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complementos; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

El término «región Fc» en la presente se utiliza para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye, por ejemplo, regiones Fc de secuencia natural, regiones Fc recombinantes y regiones Fc variantes. A pesar de que los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define a menudo para extenderse desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226 (del sistema de numeración de EU), o desde Pro230 (del sistema de numeración EU),

hasta el extremo carboxilo de esta. Es posible eliminar la lisina del extremo C (residuo 447 del sistema de numeración EU) de la región Fc, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante la modificación recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. A continuación, se proporciona una secuencia ilustrativa de la región Fc (dominio CH2 = texto en negrita; dominio CH3 = texto subrayado):

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQOGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:76).

Una «región Fc funcional» posee una «función efectora» de una región Fc de secuencia natural. Los ejemplos de «funciones efectoras» incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), y similares. Dichas funciones efectoras, en general, necesitan que la región Fc se combine con una región de unión o un dominio de unión (por ejemplo, una región o un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse mediante el uso de diversos ensayos, tal como se describe.

Una «región Fc de secuencia natural» comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza, y no está manipulada, modificada y/o cambiada (por ejemplo, aislada, purificada, seleccionada, incluida o combinada con otras secuencias tales como secuencias de región variable) por un ser humano. Las regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos A y no A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia natural; una región Fc de IgG3 humana de secuencia natural; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes de origen natural de estas.

Una «región Fc variante» comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución, adición o eliminación), preferentemente, una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante descrita en la presente puede tener al menos alrededor de 80 % de homología con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de polipéptido original o al menos alrededor de 90 % de homología con estas, por ejemplo, al menos alrededor de 95 % de homología con estas. La región Fc variante descrita en la presente puede tener una pérdida de

función efectora (por ejemplo, Fc silenciosa).

El término «cadena pesada», cuando se usa en referencia a un anticuerpo, se refiere a una cadena de polipéptidos de alrededor de 50-70 kDa, en donde la parte del extremo amino incluye una región variable de alrededor de 120 a 130 o más aminoácidos, y una parte del extremo carboxi incluye una o más regiones constantes. La «cadena pesada» puede hacer referencia a cualquier tipo distinto, por ejemplo, alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), según la secuencia de aminoácidos de la región constante, que dan lugar a las clases de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluidas las subclases de IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Tal como se usa en la presente, el término «cadena ligera», cuando se usa en referencia a un anticuerpo, puede hacer referencia a una cadena de polipéptidos de alrededor de 25 kDa, en donde la parte del extremo amino incluye una región variable de alrededor de 100 a alrededor de 110 o más aminoácidos, y una parte del extremo carboxi incluye una región constante. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Hay dos tipos distintos, por ejemplo, kappa (κ) o lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera son bien conocidas en la técnica.

Los términos «fragmento de unión al antígeno», «dominio de unión al antígeno», «región de unión al antígeno», y términos similares, se refieren a una parte de un anticuerpo que comprende residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al fragmento o región de unión su especificidad y afinidad por el antígeno (por ejemplo, las CDR). «Fragmento de unión al antígeno», tal como se usa en la presente, incluye «fragmento de anticuerpo», que comprende una parte de un anticuerpo que incluye una o más CDR, tal como la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo.

Los anticuerpos descritos en la presente incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, incluidos los anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, Fv de cadena simple (scFv) (por ejemplo, incluidos los monoespecíficos, biespecíficos y similares), anticuerpos camelizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.

En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, tales como moléculas que contienen uno o más sitios de unión al antígeno que se unen a TF.

Un anticuerpo contra TF, tal como se describe en la presente, puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY), cualquier clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2) o cualquier subclase (por ejemplo, IgG2a o IgG2b) de molécula de inmunoglobulina. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF, tal como se describe en la presente, es un

anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG humana), o una clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) o una subclase de esta.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF es una unidad de anticuerpo de 4 cadenas que comprende dos pares de cadena pesada (H)/cadena ligera (L), en donde las secuencias de aminoácidos de las cadenas H son idénticas y las secuencias de aminoácidos de las cadenas L son idénticas. En algunas modalidades, las cadenas H y/o L comprenden regiones constantes, por ejemplo, regiones constantes humanas. En algunas modalidades, la región constante de cadena L de un anticuerpo contra TF es una región constante de cadena ligera kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de cadena ligera kappa o lambda humana. En algunas modalidades, la región constante de cadena H de un anticuerpo contra TF comprende una región constante de cadena pesada gamma, por ejemplo, una región constante de cadena pesada gamma humana. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una región constante de IgG, por ejemplo, regiones constantes de IgG humana (por ejemplo, regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4).

Tal como se usa en la presente, «anticuerpo contra TF» y «anticuerpo que se une a TF» se usan indistintamente y se refieren a un anticuerpo que se une preferentemente a TF. Un anticuerpo o fragmento de este puede unirse preferentemente a TF, tal como TF humano, lo que significa que el anticuerpo o fragmento de este se une a TF, tal como TF humano, con mayor afinidad que la que se une a una proteína de control no relacionada. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de este puede reconocer y unirse específicamente a TF o una parte de este. «Unión específica» significa que el anticuerpo contra TF o un fragmento de este se une al TF con una afinidad que es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 o 10.000 veces mayor que la afinidad por una proteína de control no relacionada (por ejemplo, lisozima de clara de huevo de gallina). En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF o un fragmento de este puede unirse a TF de forma sustancialmente exclusiva (por ejemplo, es capaz de distinguir a TF de otros polipéptidos conocidos, por ejemplo, en virtud de diferencias medibles en la afinidad de unión). En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF puede reaccionar con secuencias de TF distintas de las secuencias TF humanas (por ejemplo, secuencias de TF de cynomolgus).

Los términos «región variable» y «dominio variable» se usan indistintamente para hacer referencia a una parte de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo que generalmente se ubican en el extremo amino de la cadena ligera y pesada, tiene una longitud de alrededor de 120 a 130 aminoácidos en la cadena pesada, alrededor de 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, y se utiliza en la unión y especificidad de cada anticuerpo para su antígeno. La región variable de la cadena pesada se denomina en la presente «VH». La región variable de la cadena ligera se denomina en la presente «VL». El término «variable» se refiere al hecho de que ciertos segmentos de las regiones variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos. La región V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo

concreto por su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los 110 aminoácidos de las regiones variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos menos variables (por ejemplo, relativamente invariantes) llamados regiones marco (FR) de alrededor de 15 a 30 aminoácidos separados por regiones más cortas de mayor variabilidad (por ejemplo, variabilidad extrema) llamadas «regiones hipervariables» o, alternativamente, llamadas «regiones determinantes de complementariedad». Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera comprenden, cada una, cuatro estructuras (FR1, FR2, FR3 y FR4), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en proximidad por las estructuras y, junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)). Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tal como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las regiones variables difieren ampliamente en secuencia entre diferentes anticuerpos. La variabilidad en la secuencia se concentra en las CDR, mientras que las partes menos variables en la región variable se denominan regiones marco (FR). Las CDR de las cadenas ligera y pesada son las principales responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno. En modalidades específicas, la región variable es una región variable humana.

Los términos «región hipervariable», «HVR», «HV», «región determinante de la complementariedad» y «CDR», cuando se usan en la presente, hacen referencia a las regiones de la región variable de un anticuerpo que son hipervariables en cuanto a secuencia y/o que forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables: tres en VH (H1 o CDR1 de VH, H2 o CDR2 de VH, y H3 o CDR3 de VH), y tres en VL (L1 o CDR1 de VL, L2 o CDR2 de VL, y L3 o CDR3 de VL). En la presente se usan y quedan comprendidas diversas descripciones de las regiones hipervariables. Las CDR de Kabat se basan en la variabilidad de la secuencia y son las más utilizadas (véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere, en cambio, a la ubicación de los bucles estructurales (véase, por ejemplo, Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia, cuando se numera mediante el uso de la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si no está presente ni 35A ni 35B, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33;

si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (véase, por ejemplo, Martin, en *Antibody Engineering*, Vol. 2, Capítulo 3, Springer Verlag). Las regiones hipervariables de «contact» se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. A continuación, se describen los residuos de cada una de estas regiones hipervariables o CDR.

Se ha desarrollado y adoptado ampliamente un sistema de numeración universal, el Sistema de Información ImMunoGeneTics (IMGT®) (Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77 (2003)). IMGT® es un sistema de información integrado especializado en inmunoglobulinas (IG), receptores de linfocitos T (TR) y complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de seres humanos y otros vertebrados. En la presente, se hace referencia a las CDR en términos de secuencia de aminoácidos y la ubicación dentro de la cadena ligera y pesada. Como la «ubicación» de las CDR dentro de la estructura de la región variable de inmunoglobulina se conserva entre especies y está presente en estructuras llamadas bucles, mediante el uso de sistemas de numeración que alinean las secuencias de la región variable de características estructurales, los residuos de CDR y de marco se identifican fácilmente. Esta información se puede utilizar para injertar y reemplazar residuos de CDR de inmunoglobulinas de una especie en un marco aceptor de, típicamente, un anticuerpo humano. Honegger y Plückthun desarrollaron un sistema de numeración adicional (AHon), *J. Mol. Biol.* 309: 657-670 (2001). La correspondencia entre el sistema de numeración, que incluye, por ejemplo, la numeración de Kabat y el sistema de numeración único IMGT®, es bien conocida por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, *supra*; Chothia y Lesk, *supra*; Martin, *supra*; Lefranc et al., *supra*) y también se ilustra a continuación. Varios sistemas conocidos en la técnica o descritos en la presente representan diferentes formas de delinear CDR y, cuando se utilizan para definir el mismo anticuerpo, a menudo se consideran equivalentes. Un sistema ilustrativo, que se muestra en la presente, combina las definiciones de Kabat y Chothia.

	Ejemplo	IMGT®	Kabat	AbM	Chothia	Contact
CDR1 de V_H	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
CDR2 de V_H	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
CDR3 de V_H	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
CDR1 de V_L	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
CDR2 de V_L	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
CDR3 de V_L	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

Las regiones hipervariables pueden comprender «regiones hipervariables extendidas» de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL y 26-35

o 26-35A (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Tal como se usan en la presente, los términos «región hipervariable», «HVR», «HV», «región determinante de complementariedad» o «CDR» se usan indistintamente.

El término «vector» se refiere a una sustancia que se utiliza para transportar o incluir una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, para introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen vectores de expresión, plásmidos, vectores de fagos, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, que pueden incluir secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en el cromosoma de una célula hospedadora. Además, un vector puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de la expresión adecuadas. Los genes marcadores seleccionables que pueden incluirse, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan las deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos que no se encuentran en los medios de cultivo. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares, que son bien conocidos en la técnica. Cuando se van a coexpresar dos o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una cadena pesada y ligera de un anticuerpo o una región VH y VL de un anticuerpo), ambas moléculas de ácido nucleico se pueden insertar, por ejemplo, en un único vector de expresión o en vectores de expresión separados. Para la expresión de un solo vector, los ácidos nucleicos codificantes pueden unirse operativamente a una secuencia de control de expresión común o unirse a diferentes secuencias de control de expresión, tal como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La introducción de moléculas de ácido nucleico en una célula hospedadora puede confirmarse mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos, tales como transferencias Northern o amplificación de ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o inmunotransferencia para la expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos adecuados para evaluar la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida o su producto génico correspondiente. Los expertos en la técnica entienden que las moléculas de ácido nucleico se expresan en una cantidad suficiente para producir un producto deseado (por ejemplo, un anticuerpo contra TF), y entienden, además, que los niveles de expresión se pueden optimizar para obtener una expresión suficiente mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica.

Los términos «enfermedad mediada por TF», «trastorno mediado por TF» y «afección mediada por TF» se usan indistintamente y se refieren a cualquier enfermedad, trastorno o afección asociada o caracterizada por células que expresan TF, tales como las células tumorales que expresan TF. Una enfermedad mediada por TF incluye un cáncer que incluye, de modo no taxativo, cánceres que expresan o sobreexpresan TF.

El término «tumor», en cualquier modalidad de la presente, se refiere a cualquier crecimiento o

proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos «cáncer» y «canceroso» hacen referencia a las condiciones fisiológicas en mamíferos que se caracterizan típicamente por crecimiento celular no regulado o las describen. El término «ADC» se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco, que en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo contra TF, que está acoplado a otro resto que incluye un fármaco, tal como se describe en la presente.

Tal como se usa en la presente, «fármaco» se refiere a un compuesto que tiene actividad biológica, tal como un compuesto citotóxico (por ejemplo, una pequeña molécula citotóxica, un péptido sintético citotóxico y similares).

Los ejemplos de fármacos incluyen fármacos de moléculas pequeñas, tales como un agente quimioterapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo (o fragmento de este) que tiene especificidad para una célula tumoral, el anticuerpo puede modificarse tal como se describe en la presente para que incluya un aminoácido modificado, que puede conjugarse posteriormente con un agente quimioterapéutico contra el cáncer. Los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen compuestos no peptídicos (es decir, no proteicos) que reducen la proliferación de células cancerosas y abarcan agentes citotóxicos y agentes citoestáticos. Los ejemplos no taxativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides de plantas (vinca) y hormonas esteroides. También se pueden utilizar compuestos peptídicos.

Los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer adecuados incluyen dolastatina y análogos activos y derivados de esta y auristatina y análogos activos y derivados de esta (por ejemplo, monometil auristatina D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF) y similares). Véase, por ejemplo, WO 96/33212, WO 96/14856 y U.S. 6.323.315. Por ejemplo, la dolastatina 10 o la auristatina PE se pueden incluir en un TF-ADC de la presente descripción. Los agentes quimioterapéuticos adecuados contra el cáncer también incluyen maitansinoides y análogos activos y derivados de estos (véase, por ejemplo, EP 1391213; y Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623); duocarmicinas y análogos activos y derivados de estas (por ejemplo, incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB 1-TM1); y benzodiazepinas y análogos activos y derivados de estas (por ejemplo, pirrolobenzodiazepina (PBD)).

Los agentes que actúan para reducir la proliferación celular son conocidos en la técnica y se utilizan ampliamente. Tales agentes incluyen agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos y triazenos, que incluyen, de modo no taxativo, mecloretamina, ciclofosfamida (CYNOTAN™), melfalan (L-sarcolisina), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU), estreptozocina, clorozotocina, mostaza de uracilo, clormetina, ifosfamida, clorambucilo, pipobromán, trietilenmelamina,

trietilentiofosforamina, busulfán, dacarbazina y temozolomida.

Los agentes antimetabolitos incluyen análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa, que incluyen, de modo no taxativo, citarabina (CYTOSAR-U®), arabinósido de citosina, fluorouracilo (5-FU), floxuridina (FudR), 6-tioguanina, 6-mercaptopurina (6-MP), pentostatina, 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, 10-propargil-5,8-dideazafolato (PDDF, CB3717), ácido 5,8-dideazatetrahidrofólico (DDATHF), leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Los productos naturales adecuados y sus derivados, (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas), incluyen, de modo no taxativo, Ara-C, paclitaxel (TAXOL®), docetaxel (TAXOTERE®), deoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina; brequinar; alcaloides, por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, y similares; podofilotoxinas, por ejemplo, etoposida, teniposida, y similares; antibióticos, por ejemplo, antraciclina, clorhidrato de daunorrubicina (daunomicina, rubidomicina, cerubidina), idarrubicina, doxorrubicina, epirubicina y derivados de morfolino, y similares; fenoxizona bisciclopéptidos, por ejemplo, dactinomicina; glicopéptidos básicos, por ejemplo, bleomicina; glicósidos de antraquinona, por ejemplo, plicamicina (mitramicina); antracenediones, por ejemplo, mitoxantrona; azirinopirrolo indolediones, por ejemplo, mitomicina; inmunosupresores macrocíclicos, por ejemplo, ciclosporina, FK-506 (tacrolimus, prograf), rapamicina, y similares; y similares.

Otros agentes citotóxicos anti-proliferativos son navelbino, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

Los agentes que afectan a los microtúbulos que tienen actividad antiproliferativa también son adecuados para su uso e incluyen, de modo no taxativo, alocolchicina (NSC 406042), halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de la colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolstatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (TAXOL®), derivados de TAXOL®, docetaxel (TAXOTERE®), tiocolchicina (NSC 361792), tritil cisterina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, epotilonas naturales y sintéticas que incluyen, de modo no taxativo, eoftilona A, epotilona B, discodermolida; estramustina, nocodazol y similares.

Los moduladores hormonales y esteroides (incluidos los análogos sintéticos) que son adecuados para su uso incluyen, entre otros, adrenocorticosteroides, por ejemplo, prednisona, dexametasona y similares; estrógenos y pregestinas, por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, estradiol, clomifeno, tamoxifeno; y similares; supresores adrenocorticales, por ejemplo, aminoglutetimida; 17 α -etinilestradiol; dietilestilbestrol, testosterona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de

medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida (DROGENIL®), toremifeno (FARESTON®) y goserelina (ZOLADEX®), y similares. Los estrógenos estimulan la proliferación y diferenciación, por lo tanto, los compuestos que se unen al receptor de estrógeno se utilizan para bloquear esta actividad. Los corticosteroides pueden inhibir la proliferación de linfocitos T.

Otros agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen complejos metálicos, por ejemplo, cisplatino (cis-DDP), carboplatino y similares; ureas, por ejemplo, hidroxurea; hidrazinas, por ejemplo, N-metilhidrazina; epidofilotoxina; un inhibidor de la topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; leucovorina; tegafur; y similares. Otros agentes antiproliferativos de interés incluyen inmunosupresores, por ejemplo, ácido micofenólico, talidomida, desoxispergualina, azasporina, leflunomida, mizoribina, azaspirano (SKF 105685); gefitinib (IRESSA®, ZD 1839, 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-metoxi-6-(3-(4-morfolinil)propoxi)quinazolina); y similares.

Los taxanos son adecuados para su uso. Los «taxanos» incluyen paclitaxel, así como cualquier profármaco o derivado de taxano activo. «Paclitaxel» (que debe entenderse que en la presente incluye análogos, formulaciones y derivados tales como, por ejemplo, docetaxel, TAXOL®, TAXOTERE® (una formulación de docetaxel), análogos de 10-desacetilo de paclitaxel y análogos de 3'-N-desbenzoil-3'-N-t-butoxicarbonilo de paclitaxel) puede prepararse fácilmente mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la técnica (véase también WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076; las patentes estadounidenses n.º 5.294.637; 5.283.253; 5.279.949; 5.274.137; 5.202.448; 5.200.534; 5.229.529; y EP 590.267), u obtenerse de una variedad de fuentes comerciales, incluidas, por ejemplo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. (T7402 de *Taxus brevifolia*; o T-1912 de *Taxus yannanensis*). Debe entenderse que paclitaxel se refiere no solo a la forma químicamente disponible común de paclitaxel, sino también a análogos y derivados (por ejemplo, TAXOTERE®, docetaxel, tal como se indica en la presente) y conjugados de paclitaxel (por ejemplo, paclitaxel-PEG, paclitaxel-dextrano o paclitaxel-xilosa).

También se incluyen dentro del término «taxano» una variedad de derivados conocidos, incluidos tanto derivados hidrófilos como derivados hidrófobos. Los derivados de taxano incluyen, de modo no taxativo, los derivados de galactosa y manosa descritos en la solicitud de patente internacional n.º WO 99/18113; piperazino y otros derivados descritos en WO 99/14209; los derivados de taxano descritos en WO 99/09021, WO 98/22451 y la patente estadounidense n.º 5.869.680; los derivados de 6-tio descritos en WO 98/28288; los derivados de sulfenamida descritos en la patente estadounidense n.º 5.821.263; y el derivado de taxol descrito en la patente estadounidense n.º 5.415.869. Incluye, además, profármacos de paclitaxel, que incluyen, de modo no taxativo, los descritos en WO 98/58927; WO 98/13059; y la patente estadounidense n.º 5.824.701.

Los modificadores de la respuesta biológica adecuados para su uso incluyen, de modo no taxativo, (1) inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa (RTK); (2) inhibidores de la actividad

de la serina/treonina cinasa; (3) antagonistas de los antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno tumoral; (4) agonistas del receptor de la apoptosis; (5) interleucina-2; (6) IFN- α ; (7) IFN- γ ; (8) factores estimulantes de colonias; y (9) inhibidores de la angiogénesis.

Una «cantidad eficaz» es generalmente una cantidad suficiente para reducir la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, eliminar los síntomas y/o la causa subyacente, prevenir la aparición de los síntomas y/o su causa subyacente, y/o mejorar o remediar el daño que resulta de o está asociado con una enfermedad, trastorno o afección. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una cantidad terapéuticamente eficaz.

El término «cantidad terapéuticamente eficaz», tal como se usa en la presente, se refiere a la cantidad de un anticuerpo o ADC descrito en la presente que es suficiente para reducir y/o mejorar la gravedad y/o duración de una enfermedad, trastorno o afección determinada, y/o un síntoma relacionado con esta. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, incluido un agente terapéutico, puede ser una cantidad necesaria para (i) la reducción o mejora del avance o progresión de una enfermedad, trastorno o afección dada, (ii) la reducción o mejora de la recurrencia, desarrollo o aparición de una enfermedad, trastorno o afección dada, y/o (iii) para mejorar o aumentar el efecto terapéutico de otra terapia (por ejemplo, una terapia distinta a la administración de un anticuerpo o ADC descrito en la presente). Una «cantidad terapéuticamente eficaz» de una sustancia/molécula/agente de la presente descripción (por ejemplo, un anticuerpo contra TF o ADC) puede variar en función de una serie de factores, tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula/agente para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz comprende una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula/agente se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. En algunas modalidades, el término «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro agente (por ejemplo, o fármaco) eficaz para «tratar» una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto o mamífero.

En algunas modalidades, el fármaco es un agente que afecta a los microtúbulos y que tiene actividad antiproliferativa, tal como un maitansinoide. En algunas modalidades, el fármaco es un agente antimetabólico, tal como una auristatina o un análogo de auristatina activo o un derivado de este. En algunas modalidades, el fármaco es un agente alquilante de ADN.

El término «farmacéuticamente aceptable», tal como se usa en la presente, significa estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o incluido en la Farmacopea de los EE. UU., la Farmacopea Europea u otra Farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en humanos.

Los «excipientes» incluyen portadores, excipientes, conservantes o estabilizadores que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a ellos en las dosis y concentraciones empleadas

y pueden incluirse, por ejemplo, para afectar la estabilidad, aumentar el volumen de las formulaciones o conferir una mejora terapéutica al ingrediente activo en la forma de dosificación final (por ejemplo, facilitando la absorción, reduciendo la viscosidad, mejorando la solubilidad). Un «excipiente» puede ser un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético con el que se combina el ingrediente activo para facilitar el uso del ingrediente activo, por ejemplo, la administración del ingrediente activo a un sujeto. Los ejemplos de excipientes incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de alrededor de diez residuos de aminoácidos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos tales como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcohólicos tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™. El término «excipiente» también puede hacer referencia a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo o incompleto)), excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos excipientes pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, tales como los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un excipiente ilustrativo cuando una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones de glicerol y dextrosa acuosas tales como excipientes líquidos, particularmente, para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados (por ejemplo, excipientes farmacéuticos) incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, en cualquier modalidad, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes de amortiguación de pH. Las composiciones pueden tener forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Las composiciones orales, tales como formulaciones, pueden incluir excipientes estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. En Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2020) (Elsevier Science, Ámsterdam, Países Bajos) se describen ejemplos de excipientes adecuados, incluidos los compuestos farmacéuticos, que pueden contener una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de un TF-ADC, por ejemplo, en forma aislada o purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente para proporcionar la forma para la administración adecuada al sujeto. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

Antes de describir más a fondo la presente invención, se entenderá que esta descripción no se limita a las modalidades particulares descritas, ya que evidentemente estas pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el objetivo de describir únicamente modalidades particulares, y no se pretende que sea taxativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se deberá entender que cada valor involucrado, hasta la décima de la unidad del límite inferior salvo que el contexto claramente establezca lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o involucrado en ese intervalo establecido, están comprendidos dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están incluidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyan cualquiera o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

Se aprecia que determinadas características de la invención que se describen, por motivos de claridad, en el contexto de modalidades independientes, también pueden proporcionarse en combinación en una sola modalidad. Por el contrario, diversas características de la invención que se describen, por motivos de brevedad, en el contexto de una sola modalidad, también pueden proporcionarse de forma independiente o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las modalidades pertenecientes a la invención están específicamente abarcadas por la presente invención y se describen en la presente tal como si todas y cada una de las combinaciones se describieran individual y explícitamente, en la medida en que dichas combinaciones abarcan temas que son, por ejemplo, compuestos que son compuestos estables (es decir, compuestos que se pueden preparar, aislar, caracterizar y evaluar para determinar su actividad biológica). Además, todas las subcombinaciones de las diversas modalidades y elementos de las mismas (por ejemplo, elementos de los grupos químicos enumerados en las modalidades que describen dichas variables) también están específicamente abarcadas por la presente invención y se divulgan en este documento tal como si todas y cada una de dichas subcombinaciones se divulgaran individual y explícitamente en este documento.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que normalmente les atribuye el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para llevar a la práctica o analizar la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales ilustrativos. Todas las publicaciones mencionadas en este documento se incorporan aquí como referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

Cabe destacar que, tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones

adjuntas, las formas singulares «un», «una» y «el/la» incluyen las formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse de modo que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva como «únicamente», «solamente» y similares en relación con la recitación de elementos de reclamación o el uso de una limitación «negativa».

Se aprecia que determinadas características de la invención que se describen, por motivos de claridad, en el contexto de modalidades independientes, también pueden proporcionarse en combinación en una sola modalidad. Por el contrario, diversas características de la invención que se describen, por motivos de brevedad, en el contexto de una sola modalidad, también pueden proporcionarse de forma independiente o en cualquier subcombinación adecuada.

Las publicaciones aquí analizadas se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí expuesto debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

TF-ADC

Un anticuerpo que se une a TF (también denominado en la presente «anticuerpo contra TF», «anticuerpo anti-TF», «Ab TF», «Ab» o «anticuerpo») y un fármaco pueden unirse directa o indirectamente entre sí a través de un resto de acoplamiento de piridazina-pirrolo para formar un TF-ADC, tal como se describe en la presente. En ciertas modalidades, el anticuerpo contra TF y los dos o más fármacos o agentes activos están unidos entre sí a través de uno o más grupos funcionales y enlaces covalentes. Por ejemplo, los uno o más grupos funcionales y enlaces covalentes pueden incluir un enlazador ramificado como se describe en este documento.

Las fracciones de interés (por ejemplo, fármacos o agentes activos) se pueden conjugar con el anticuerpo contra TF en cualquier sitio deseado del anticuerpo. Por lo tanto, la presente descripción proporciona, por ejemplo, un anticuerpo contra TF que tiene fracciones conjugadas en dos o más sitios en el anticuerpo, tal como un sitio en o cerca del extremo C del anticuerpo, una posición en o cerca del extremo N del anticuerpo y una posición entre el extremo C y el extremo N del anticuerpo (por ejemplo, en un sitio interno del anticuerpo). También son posibles combinaciones de los sitios de conjugación anteriores.

En ciertas modalidades, un conjugado de la presente descripción incluye dos (o más) fármacos o agentes activos conjugados con un residuo de aminoácido de un anticuerpo contra TF en el carbono α de un residuo de aminoácido. Dicho de otra manera, un conjugado incluye un anticuerpo contra TF donde la cadena lateral de un residuo de aminoácido en el anticuerpo ha sido modificada y se une a dos (o más) fármacos o agentes activos (por ejemplo, se une a dos

fármacos o agentes activos a través de un enlazador ramificado, tal como se describe en la presente). Por ejemplo, un conjugado incluye un anticuerpo contra TF donde el α -carbono de un residuo de aminoácido en el anticuerpo ha sido modificada y se une a dos fármacos o agentes activos (por ejemplo, se une a dos fármacos o agentes activos a través de un enlazador ramificado, tal como se describe en la presente).

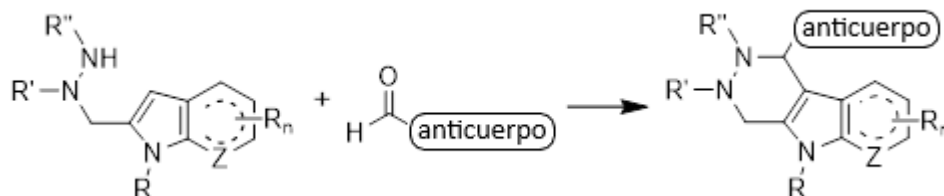
Las modalidades de la presente descripción incluyen conjugados donde un anticuerpo contra TF está conjugado con dos o más fracciones, tales como 3 fracciones, 4 fracciones, 5 fracciones, 6 fracciones, 7 fracciones, 8 fracciones, 9 fracciones, 10 fracciones, 11 fracciones, 12 fracciones, 13 fracciones, 14 fracciones, 15 fracciones, 16 fracciones, 17 fracciones, 18 fracciones, 19 fracciones o 20 o más fracciones. Las fracciones pueden conjugarse con el anticuerpo contra TF en múltiples sitios del anticuerpo. En algunas modalidades, dos fracciones pueden conjugarse con un único residuo de aminoácido del anticuerpo contra TF. Por ejemplo, dos fracciones pueden conjugarse con el mismo residuo de aminoácido del anticuerpo contra TF. En otras modalidades, dos fracciones se conjugan a un primer residuo de aminoácido del anticuerpo contra TF y otras dos fracciones se conjugan a un segundo residuo de aminoácido del anticuerpo contra TF. Por ejemplo, un anticuerpo contra TF se puede conjugar con una primera y una segunda porción en un primer residuo de aminoácido y conjugar con una tercera y una cuarta porción en un segundo residuo de aminoácido, etc. En algunos casos, dos o más residuos de aminoácidos en el anticuerpo contra TF se conjugan cada uno con un par de porciones (es decir, dos porciones), donde cada par de porciones se conjuga con el anticuerpo contra TF a través de un enlazador ramificado como se describe en este documento. En algunos casos, 1 residuo de aminoácido en el anticuerpo contra TF se conjuga a un par de fracciones a través de un enlazador ramificado como se describe en este documento. En otros casos, 2 o más residuos de aminoácidos, tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más residuos de aminoácidos en el anticuerpo contra TF se conjugan cada uno a un par de fracciones a través de un enlazador ramificado como se describe en este documento.

Los uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo contra TF que están conjugados con las fracciones de interés pueden ser aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el conjugado puede incluir fracciones de interés (por ejemplo, fármacos o agentes activos) conjugados con un residuo de aminoácido natural del anticuerpo contra TF. En otros casos, el conjugado puede incluir fracciones de interés conjugadas a un residuo de aminoácido no natural del anticuerpo contra TF. Las fracciones de interés pueden conjugarse con el anticuerpo contra TF en un único residuo de aminoácido natural o no natural como se describió anteriormente. Uno o más residuos de aminoácidos naturales o no naturales en el anticuerpo contra TF pueden conjugarse con las fracciones de interés como se describe en este documento. Por ejemplo, dos (o más) residuos de aminoácidos (por ejemplo, residuos de aminoácidos naturales o no naturales) en el anticuerpo contra TF pueden conjugarse

cada uno con dos fracciones a través de un enlazador ramificado, de modo que múltiples sitios en el anticuerpo contra TF se conjugan con las fracciones de interés.

Como se describe en este documento, un anticuerpo contra TF puede conjugarse con dos o más fracciones de interés. En ciertas modalidades, la fracción de interés es una carga activa, por ejemplo, una entidad química, tal como un fármaco, un agente activo o una etiqueta detectable. Por ejemplo, los medicamentos (o agentes activos, como las citocinas) se pueden conjugar con el anticuerpo contra TF o, en otras modalidades, se pueden conjugar etiquetas detectables con el anticuerpo contra TF. En otras modalidades, se pueden conjugar combinaciones de diferentes cargas activas con el anticuerpo contra TF. Así, por ejemplo, las modalidades de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: un conjugado de un anticuerpo contra TF y dos o más fármacos; un conjugado de un anticuerpo contra TF y dos o más agentes activos, tales como citocinas; un conjugado de un anticuerpo contra TF y dos o más etiquetas detectables; y combinaciones de los mismos.

En ciertas modalidades, el anticuerpo contra TF y las fracciones de interés (por ejemplo, fármacos o agentes activos) se conjugan a través de una fracción de conjugación. Por ejemplo, el anticuerpo contra TF y las fracciones de interés pueden estar cada uno unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) a la fracción de conjugación, uniendo así indirectamente el anticuerpo contra TF y las fracciones de interés entre sí a través de la fracción de conjugación. En algunos casos, la fracción de conjugación incluye un compuesto hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo, o un derivado de un compuesto hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo. Por ejemplo, un esquema general para acoplar fracciones de interés a un anticuerpo contra TF a través de una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo se muestra en el esquema de reacción general a continuación. Las fracciones de conjugación hidrazinil-indolilo e hidrazinil-pirrolo-piridinilo también se denominan en este documento fracción de conjugación hidrazino-*iso*-Pictet-Spengler (HIPS) y fracción de conjugación aza-hidrazino-*iso*-Pictet-Spengler (azaHIPS), respectivamente. En consecuencia, en algunas modalidades, un experto en la materia entenderá que el carbono que se denota en una fórmula como la divulgada en este documento, como la Fórmula (I) o (II), como inmediatamente adyacente a Ab era originalmente una parte del anticuerpo antes de la conjugación. En algunas modalidades, este carbono está conjugado con un residuo (fGly'), conjugando así el anticuerpo y la carga activa del enlazador. En otras modalidades, este carbono se interpreta como parte de un residuo (fGly') que conjuga el anticuerpo y la carga activa del enlazador.



En el esquema de reacción anterior, cada R incluye independientemente una fracción de interés (por ejemplo, fármaco o agente activo) que está conjugada con el anticuerpo contra TF (por ejemplo, conjugada con el anticuerpo contra TF a través de un enlazador como se describe en este documento), donde n es un número entero de 1 a 4. Como se muestra en el esquema de reacción anterior, una fracción de conjugación (por ejemplo, una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo) está unida a dos o más fármacos o agentes activos, R. Un anticuerpo contra TF que incluye un residuo de 2-formilglicina (fGly) se hace reaccionar con la fracción de conjugación para producir un conjugado de anticuerpo contra TF, uniendo así los dos o más fármacos o agentes activos al anticuerpo contra TF a través de la fracción de conjugación.

Como se describe en este documento, los grupos pueden ser cualquiera de una variedad de grupos tales como, pero no limitados a, entidades químicas, tales como etiquetas detectables, o medicamentos o agentes activos. cada uno de R' y R'' puede ser independientemente cualquier sustituyente deseado, tal como, de modo no taxativo hidrógeno, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido; Z puede ser CR²¹, NR²², N, O o S, donde R²¹ y R²² se seleccionan cada uno independientemente de cualquiera de los sustituyentes descritos para R' y R'' anteriormente.

También son posibles otras fracciones de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo, como se muestra en los conjugados y compuestos descritos en este documento. Por ejemplo, las fracciones de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo pueden estar unidas (por ejemplo, unidas covalentemente) a dos o más enlaces. Como tal, las modalidades de la presente descripción incluyen una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo unida a dos o más fármacos o agentes activos, cada uno a través de un conector correspondiente. Por lo tanto, los conjugados de la presente descripción pueden incluir dos o más enlazadores, donde cada enlazador une un fármaco o agente activo correspondiente a la fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo. En consecuencia, la fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo y dos o más enlaces pueden considerarse en general como un "enlazador ramificado", donde la fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo está unida a dos o más

"ramificaciones", donde cada ramificación incluye un enlace unido a un fármaco o agente activo. Se pueden conjugar combinaciones de cargas activas iguales o diferentes con el anticuerpo contra TF a través del enlazador ramificado. En determinadas modalidades, las dos cargas activas (por ejemplo, fármacos, agentes activos o marcadores detectables) unidas al enlazador ramificado son la misma carga activa (por ejemplo, fármaco, agente activo o marcador detectable). Por ejemplo, una primera rama de un enlazador ramificado puede estar unida a una carga activa (por ejemplo, fármaco, agente activo o etiqueta detectable) y una segunda rama del enlazador ramificado puede estar unida a la misma carga activa (por ejemplo, fármaco, agente activo o marcador detectable) que la primera rama.

En otras modalidades, las dos cargas activas (por ejemplo, fármacos, agentes activos o marcadores detectables) unidas al enlazador ramificado son cargas activas diferentes (por ejemplo, fármacos, agentes activos o marcadores detectables). Por ejemplo, una primera rama de un enlazador ramificado puede estar unida a una primera carga activa (por ejemplo, un primer fármaco, agente activo o marcador detectable) y una segunda rama del enlazador ramificado puede estar unida a una segunda carga activa (por ejemplo, un segundo fármaco, agente activo o marcador detectable) diferente de la primera carga activa (por ejemplo, el primer fármaco, agente activo o marcador detectable) unida a la primera rama.

En algunas modalidades, donde dos fármacos o agentes activos diferentes están unidos al enlazador ramificado, los fármacos o agentes activos pueden seleccionarse de fármacos y agentes activos que tienen un efecto terapéutico sinérgico. Por «sinérgico», «sinergismo» o «sinergia» se entiende un efecto terapéutico mayor que la suma de los efectos de los fármacos o agentes activos tomados por separado. Por ejemplo, en algunos casos, el uso de dos fármacos o agentes activos diferentes unidos al enlazador ramificado puede proporcionar una concentración terapéuticamente eficaz más baja en la que actúan ambas cargas activas, aumentando de ese modo la potencia general del ADC.

En algunas modalidades, donde dos fármacos o agentes activos diferentes están unidos al enlazador ramificado, los fármacos o agentes activos pueden seleccionarse de fármacos y agentes activos que proporcionan un beneficio terapéutico mejorado en comparación con el uso de los fármacos o agentes activos por separado. Por ejemplo, los fármacos o agentes activos pueden proporcionar un mayor efecto en la administración del fármaco al ADC (por ejemplo, algunas cargas activas, tal como el péptido iRGD, pueden aumentar la extravasación a los tejidos y aumentar la penetración en el tumor).

En algunas modalidades, donde dos fármacos o agentes activos diferentes están unidos al enlazador ramificado, los fármacos o agentes activos pueden seleccionarse de fármacos y agentes activos que usan mecanismos de acción diferentes. En algunos casos, esto puede generar una disminución en la resistencia a los fármacos contra los tumores al dirigirse a múltiples vías. Los ejemplos de combinaciones de carga activa pueden incluir, de modo no

taxativo, fármacos citotóxicos, moléculas inmunomoduladoras para activar o inhibir poblaciones de células inmunitarias, citocinas, hormonas, agentes quelantes cargados con radioisótopos, y similares.

En algunas modalidades, donde dos cargas activas diferentes están unidas al enlazador ramificado, las cargas activas pueden seleccionarse entre combinaciones de fármacos o agentes activos y etiquetas detectables. Por ejemplo, una primera carga activa puede ser una etiqueta detectable que se utiliza como agente de formación de imágenes o trazador para detectar la ubicación del ADC *in vivo*, mientras que una segunda carga activa puede ser un fármaco o agente activo que proporciona una actividad terapéutica.

En el presente documento se describen en detalle diversas modalidades de los enlazadores que pueden acoplar la fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo a los fármacos o agentes activos. Por ejemplo, en algunos casos, el enlazador es un enlazador escindible, tal como un enlazador escindible como se describe en este documento.

En ciertas modalidades, el anticuerpo contra TF puede conjugarse con dos o más fracciones de interés, donde uno o más aminoácidos del anticuerpo contra TF se modifican antes de la conjugación con las fracciones de interés. La modificación de uno o más aminoácidos del anticuerpo contra TF puede producir un anticuerpo contra TF que contenga uno o más grupos reactivos adecuados para la conjugación con las fracciones de interés. En algunos casos, el anticuerpo contra TF puede incluir uno o más residuos de aminoácidos modificados para proporcionar uno o más grupos reactivos adecuados para la conjugación con las fracciones de interés (por ejemplo, donde dos o más fracciones están unidas a una fracción de conjugación, tal como una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo como se describió anteriormente). Por ejemplo, un aminoácido del anticuerpo contra TF puede modificarse para incluir un grupo aldehído reactivo (por ejemplo, un aldehído reactivo). Un aldehído reactivo puede incluirse en una «etiqueta de aldehído» o «etiqueta ald», que, como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos derivada de un motivo de sulfatasa (por ejemplo, L(C/S)TPSR, SEQ ID NO:99) que se ha convertido por la acción de una enzima generadora de formilglicina (FGE) para contener un residuo de 2-formilglicina (denominado en este documento como «fGly»). El residuo fGly generado por un FGE también puede denominarse «formilglicina». Dicho de otra manera, el término "etiqueta de aldehído" se utiliza en este documento para referirse a una secuencia de aminoácidos que incluye un motivo de sulfatasa "convertido" (es decir, un motivo de sulfatasa en el que un residuo de cisteína o serina se ha convertido en fGly por la acción de un FGE, por ejemplo, L(fGly)TPSR, SEQ ID NO:123). Un motivo de sulfatasa convertido se puede producir a partir de una secuencia de aminoácidos que incluye un motivo de sulfatasa «no convertido» (es decir, un motivo de sulfatasa en el que el residuo de cisteína o serina no ha sido convertido en fGly por una FGE, pero es capaz de convertirse, por ejemplo, un motivo de sulfatasa no convertido con la secuencia: LCTPSR, SEQ

ID NO:100). Por «conversión», tal como se utiliza en el contexto de la acción de una enzima generadora de formilglicina (FGE) sobre un motivo de sulfatasa, se hace referencia a la modificación bioquímica de un residuo de cisteína o serina en un motivo de sulfatasa a un residuo de formilglicina (fGly) (por ejemplo, Cys a fGly o Ser a fGly). Se describen aspectos adicionales de las etiquetas de aldehído y sus usos en la modificación de proteínas en sitios específicos en la Patente de EE. UU. N.º 7.985.783 y la Patente de EE. UU. N.º 8.729.232, cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia.

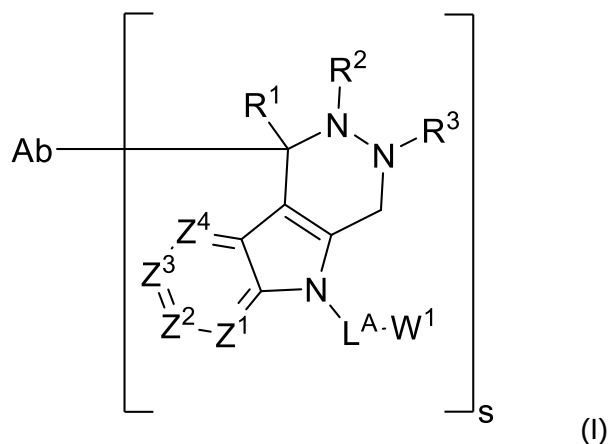
En algunos casos, para producir el conjugado, el anticuerpo contra TF que contiene el residuo fGly se puede conjugar con las fracciones de interés mediante la reacción de fGly con un compuesto (por ejemplo, un compuesto que contiene una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo, como se describió anteriormente). Por ejemplo, un anticuerpo contra TF que contiene fGly puede ponerse en contacto con un socio reactivo en condiciones adecuadas para proporcionar la conjugación de dos o más fármacos con el anticuerpo contra TF. En algunos casos, el socio reactivo puede incluir una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo como se describió anteriormente. Por ejemplo, dos o más fármacos o agentes activos pueden unirse a una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo. En algunos casos, los fármacos o agentes activos están unidos a una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo, como por ejemplo unidos covalentemente a un hidrazinil-indolilo o un hidrazinil-pirrolo-piridinilo, donde cada fármaco o agente activo está unido a través de un enlazador correspondiente a la fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo.

En ciertas modalidades, un conjugado de la presente descripción incluye un anticuerpo contra TF que tiene al menos un residuo de aminoácido que se ha unido a dos o más fracciones de interés (por ejemplo, fármacos o agentes activos). Para realizar el conjugado, se puede modificar un residuo de aminoácido del anticuerpo contra TF y luego acoplarlo a dos o más fármacos o agentes activos unidos a una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo como se describió anteriormente. En ciertas modalidades, un residuo de aminoácido del anticuerpo contra TF es un residuo de cisteína o serina que se modifica a un residuo fGly, como se describió anteriormente. En ciertas modalidades, el residuo de aminoácido modificado (por ejemplo, residuo fGly) se conjuga con dos o más fármacos o agentes activos que contienen una fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo como se describió anteriormente para proporcionar un conjugado de la presente descripción donde los dos o más fármacos o agentes activos se conjugan con el anticuerpo contra TF a través de la fracción de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo. Como se utiliza en este documento, el término fGly' se refiere al residuo de aminoácido del anticuerpo contra TF que está acoplado a las fracciones de interés (por ejemplo, fármacos o agentes activos).

En ciertas modalidades, el conjugado incluye un anticuerpo contra TF que tiene al menos un

residuo de aminoácido unido a un conector ramificado como se describe en este documento, que a su vez está unido a dos o más fármacos o agentes activos. Por ejemplo, el conjugado puede incluir un anticuerpo contra TF que tiene al menos un residuo de aminoácido (fGly') que está conjugado con las fracciones de interés (por ejemplo, fármacos o agentes activos) como se describió anteriormente.

Los aspectos de la presente descripción incluyen un conjugado con la Fórmula (I):



en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF;

cada uno de Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 se selecciona independientemente de CR^4 , N y $C-L^B-W^2$, en donde al menos uno de Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 es $C-L^B-W^2$;

R^1 se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido;

cada uno de R^2 y R^3 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, o R^2 y R^3 se enlazan opcionalmente de forma cíclica para formar un heterociclilo de 5 o 6 miembros;

cada R^4 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido;

L^A es un primer enlazador:

L^B es un segundo enlazador;

s es un número entero de 1 a 10;

W^1 es un primer fármaco; y

W^2 es un segundo fármaco.

Los sustituyentes relacionados con conjugados con la Fórmula (I) se describen con más detalle a continuación.

En determinadas modalidades, cada uno de Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 se selecciona independientemente de CR^4 , N y $C-L^B-W^2$, en donde al menos uno de Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 es $C-L^B-W^2$. En determinadas modalidades, Z^1 es CR^4 . En determinadas modalidades, Z^1 es N. En determinadas modalidades, Z^1 es $C-L^B-W^2$. En determinadas modalidades, Z^2 es CR^4 . En determinadas modalidades, Z^2 es N. En determinadas modalidades, Z^2 es $C-L^B-W^2$. En determinadas modalidades, Z^3 es CR^4 . En determinadas modalidades, Z^3 es N. En determinadas modalidades, Z^3 es $C-L^B-W^2$. En determinadas modalidades, Z^4 es CR^4 . En determinadas modalidades, Z^4 es N. En determinadas modalidades, Z^4 es $C-L^B-W^2$. En algunas modalidades, cada uno de Z^1 , Z^3 , y Z^4 es CR^4 . En algunas modalidades, Z^3 es $C-L^B-W^2$.

Son posibles las combinaciones de varios Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 . Por ejemplo, en algunos casos, Z^1 es $C-L^B-W^2$, Z^2 es CR^4 , Z^3 es CR^4 , y Z^4 es CR^4 . En algunos casos, Z^1 es CR^4 , Z^2 es $C-L^B-W^2$, Z^3 es CR^4 , y Z^4 es CR^4 . En algunos casos, Z^1 es CR^4 , Z^2 es CR^4 , Z^3 es $C-L^B-W^2$, y Z^4 es CR^4 . En algunos casos, Z^1 es CR^4 , Z^2 es CR^4 , Z^3 es CR^4 , y Z^4 es $C-L^B-W^2$.

En determinadas modalidades, R^1 se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido. En determinadas modalidades, R^1 es hidrógeno. En determinadas modalidades, R^1 es alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido, alquilo C_{1-4} o alquilo C_{1-4} sustituido, alquilo C_{1-3} o alquilo C_{1-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^1 es alquenilo o alquenilo sustituido, tal como alquenilo C_{2-6} o alquenilo C_{2-6} sustituido, o alquenilo C_{2-4} o alquenilo C_{2-4} sustituido, o alquenilo C_{2-3} o alquenilo C_{2-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^1 es alquinilo o alquinilo sustituido, tal como alquenilo C_{2-6} o alquenilo C_{2-6} sustituido, o alquenilo C_{2-4} o alquenilo C_{2-4} sustituido, o alquenilo C_{2-3} o alquenilo C_{2-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^1 es arilo o arilo sustituido, tal como arilo C_{5-8} o arilo C_{5-8} sustituido, tal como arilo C_5 o el arilo C_5 sustituido, o arilo C_6 o arilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^1 es heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como heteroarilo C_{5-8} o heteroarilo C_{5-8} sustituido, tal como heteroarilo C_5 o heteroarilo C_5 sustituido, o heteroarilo C_6 o heteroarilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^1 es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-8} o cicloalquilo C_{3-8} sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-6} o cicloalquilo C_{3-6} sustituido, o cicloalquilo C_{3-5} o cicloalquilo C_{3-5} sustituido. En determinadas modalidades, R^1 es heterociclilo o heterociclilo sustituido, tal como heterociclilo C_{3-8} o heterociclilo C_{3-8} sustituido, tal como heterociclilo C_{3-6} o heterociclilo C_{3-6} sustituido, o heterociclilo C_{3-5} o heterociclilo C_{3-5} sustituido.

En determinadas modalidades, cada uno de R^2 y R^3 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, o R^2 y R^3 se enlazan opcionalmente de forma cíclica para formar un heterociclilo de 5 o 6 miembros.

En determinadas modalidades, R^2 se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es hidrógeno. En determinadas modalidades, R^2 es alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido, alquilo C_{1-4} o alquilo C_{1-4} sustituido, alquilo C_{1-3} o alquilo C_{1-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es metilo. En determinadas modalidades, R^2 es alquenilo o alquenilo sustituido, tal como alquenilo C_{2-6} o alquenilo C_{2-6} sustituido, o alquenilo C_{2-4} o alquenilo C_{2-4} sustituido, o alquenilo C_{2-3} o alquenilo C_{2-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es alquinilo o alquinilo sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es carboxilo o éster de carboxilo. En determinadas modalidades, R^2 es acilo o aciloxi. En determinadas modalidades, R^2 es acilamino o aminoacilo. En determinadas modalidades, R^2 es alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, R^2 es sulfonilo. En determinadas modalidades, R^2 es tioalcoxi o tioalcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es arilo o arilo sustituido, tal como arilo C_{5-8} o arilo C_{5-8} sustituido, tal como arilo C_5 o el arilo C_5 sustituido, o arilo C_6 o arilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como heteroarilo C_{5-8} o heteroarilo C_{5-8} sustituido, tal como heteroarilo C_5 o heteroarilo C_5 sustituido, o heteroarilo C_6 o heteroarilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-8} o cicloalquilo C_{3-8} sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-6} o cicloalquilo C_{3-6} sustituido, o cicloalquilo C_{3-5} o cicloalquilo C_{3-5} sustituido. En determinadas modalidades, R^2 es heterociclilo o heterociclilo sustituido, tal como un heterociclilo C_{3-6} o un heterociclilo C_{3-6} sustituido, o un heterociclilo C_{3-5} o un heterociclilo C_{3-5} sustituido.

En determinadas modalidades, R^3 se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En

determinadas modalidades, R^3 es hidrógeno. En determinadas modalidades, R^3 es alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido, alquilo C_{1-4} o alquilo C_{1-4} sustituido, alquilo C_{1-3} o alquilo C_{1-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es metilo. En determinadas modalidades, R^3 es alquenilo o alquenilo sustituido, tal como alquenilo C_{2-6} o alquenilo C_{2-6} sustituido, o alquenilo C_{2-4} o alquenilo C_{2-4} sustituido, o alquenilo C_{2-3} o alquenilo C_{2-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es alquinilo o alquinilo sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es carboxilo o éster de carboxilo. En determinadas modalidades, R^3 es acilo o aciloxi. En determinadas modalidades, R^3 es acilamino o aminoacilo. En determinadas modalidades, R^3 es alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, R^3 es sulfonilo. En determinadas modalidades, R^3 es tioalcoxi o tioalcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es arilo o arilo sustituido, tal como arilo C_{5-8} o arilo C_{5-8} sustituido, tal como arilo C_5 o el arilo C_5 sustituido, o arilo C_6 o arilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como heteroarilo C_{5-8} o heteroarilo C_{5-8} sustituido, tal como heteroarilo C_5 o heteroarilo C_5 sustituido, o heteroarilo C_6 o heteroarilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-8} o cicloalquilo C_{3-8} sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-6} o cicloalquilo C_{3-6} sustituido, o cicloalquilo C_{3-5} o cicloalquilo C_{3-5} sustituido. En determinadas modalidades, R^3 es heterociclilo o heterociclilo sustituido, tal como heterociclilo C_{3-8} o heterociclilo C_{3-8} sustituido, tal como heterociclilo C_{3-6} o heterociclilo C_{3-6} sustituido, o heterociclilo C_{3-5} o heterociclilo C_{3-5} sustituido. En determinadas modalidades, tanto R^2 como R^3 son metilo.

En determinadas modalidades, R^2 y R^3 están opcionalmente enlazados de forma cíclica para formar un heterociclilo de 5 o 6 miembros. En determinadas modalidades, R^2 y R^3 están enlazados de forma cíclica para formar un heterociclilo de 5 o 6 miembros. En determinadas modalidades, R^2 y R^3 están enlazados de forma cíclica para formar un heterociclilo de 5 miembros. En determinadas modalidades, R^2 y R^3 están enlazados de forma cíclica para formar un heterociclilo de 6 miembros.

En determinadas modalidades, cada R^4 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

A continuación, se describen con más detalle las distintas posibilidades para cada R^4 . En determinadas modalidades, R^4 es hidrógeno. En determinadas modalidades, cada R^4 es hidrógeno. En determinadas modalidades, R^4 es halógeno, tal como F, Cl, Br o I. En determinadas modalidades, R^4 es F. En determinadas modalidades, R^4 es Cl. En determinadas

modalidades, R^4 es Br. En determinadas modalidades, R^4 es I. En determinadas modalidades, R^4 es alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido, alquilo C_{1-4} o alquilo C_{1-4} sustituido, alquilo C_{1-3} o alquilo C_{1-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es metilo. En determinadas modalidades, R^4 es alquenilo o alquenilo sustituido, tal como alquenilo C_{2-6} o alquenilo C_{2-6} sustituido, o alquenilo C_{2-4} o alquenilo C_{2-4} sustituido, o alquenilo C_{2-3} o alquenilo C_{2-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es alquinilo o alquinilo sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es carboxilo o éster de carboxilo. En determinadas modalidades, R^4 es acilo o aciloxi. En determinadas modalidades, R^4 es acilamino o aminoacilo. En determinadas modalidades, R^4 es alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, R^4 es sulfonilo. En determinadas modalidades, R^4 es tioalcoxi o tioalcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es arilo o arilo sustituido, tal como arilo C_{5-8} o arilo C_{5-8} sustituido, tal como arilo C_5 o el arilo C_5 sustituido, o arilo C_6 o arilo C_6 sustituido (por ejemplo, fenilo o fenilo sustituido). En determinadas modalidades, R^4 es heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como heteroarilo C_{5-8} o heteroarilo C_{5-8} sustituido, tal como heteroarilo C_5 o heteroarilo C_5 sustituido, o heteroarilo C_6 o heteroarilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-8} o cicloalquilo C_{3-8} sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-6} o cicloalquilo C_{3-6} sustituido, o cicloalquilo C_{3-5} o cicloalquilo C_{3-5} sustituido. En determinadas modalidades, R^4 es heterociclilo o heterociclilo sustituido, tal como heterociclilo C_{3-8} o heterociclilo CC_{3-8} sustituido, tal como heterociclilo C_{3-6} o heterociclilo C_{3-6} sustituido, o heterociclilo C_{3-5} o heterociclilo C_{3-5} sustituido.

En determinadas modalidades, L^A es un primer enlazador. A continuación, se describen con más detalle ejemplos de enlazadores que pueden utilizarse en los conjugados de la presente descripción.

En determinadas modalidades, L^B es un segundo enlazador. A continuación, se describen con más detalle ejemplos de enlazadores que pueden utilizarse en los conjugados de la presente descripción.

En determinadas modalidades, W^1 es un primer fármaco (o un primer agente activo). A continuación, se describen con más detalle ejemplos de fármacos y agentes activos que pueden utilizarse en los conjugados de la presente descripción.

En determinadas modalidades, W^2 es un segundo fármaco (o un segundo agente activo). A continuación, se describen con más detalle ejemplos de fármacos y agentes activos que pueden utilizarse en los conjugados de la presente descripción.

En determinadas modalidades, Ab representa un anticuerpo que se une al factor tisular («anticuerpo contra TF»). En determinadas modalidades, Ab comprende uno o más residuos fGly', tal como se describe en la presente. En determinadas modalidades, el anticuerpo contra TF se une al resto del conjugado a través de un residuo fGly', tal como se describe en la presente.

A continuación, se describen con más detalle ejemplos de anticuerpos contra TF que pueden utilizarse en los conjugados de la presente descripción.

En determinadas modalidades, el conjugado con la Fórmula (I) incluye un primer enlazador, L^A . El primer enlazador, L^A , puede utilizarse para unir un primer resto de interés (por ejemplo, un primer fármaco o agente activo) a un anticuerpo contra TF a través de un resto de conjugación. El primer enlazador, L^A , puede estar unido (por ejemplo, unido covalentemente) al resto de conjugación (por ejemplo, tal como se describe en la presente). Por ejemplo, el primer enlazador, L^A , puede unir un resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo a un primer fármaco. El resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo puede utilizarse para conjugar el primer enlazador, L^A , (y, por lo tanto, el primer fármaco) a un anticuerpo contra TF.

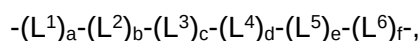
Por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anterior, L^A está unido a Ab a través de un resto de conjugación y, por lo tanto, Ab está unido indirectamente al enlazador L^A a través del resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo. Tal como se describió anteriormente, Ab es un anticuerpo contra TF y, por lo tanto, L^A está unido a través del resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo al anticuerpo contra TF, por ejemplo, el enlazador L^A está unido indirectamente al anticuerpo contra TF a través del resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo.

Se puede utilizar cualquier enlazador conveniente para el primer enlazador L^A en los conjugados y compuestos en cuestión. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo seleccionado de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, acilamino, alquilamida, alquilamida sustituida, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo alquilo o alquilo sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo alquenilo o alquenilo sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo alquinilo o alquinilo sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo carboxilo o éster carboxílico sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo acilamino. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo arilo o arilo sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo heteroarilo o heteroarilo sustituido. En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un grupo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido. En determinadas modalidades, el primer

enlazador L^A puede incluir un grupo heterociclilo o heterociclilo sustituido.

En determinadas modalidades, el primer enlazador L^A puede incluir un polímero. Por ejemplo, el polímero puede incluir un polialquilenglicol y derivados de este, incluidos polietilenglicol, metoxipolietilenglicol, homopolímeros de polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de etilenglicol con propilenglicol (por ejemplo, donde los homopolímeros y copolímeros no se sustituyen o se sustituyen en un extremo con un grupo alquilo), alcohol polivinílico, éteres de polivinil etilo, polivinilpirrolidona, combinaciones de estos, y similares. En determinadas modalidades, el polímero es un polialquilenglicol. En determinadas modalidades, el polímero es un polietilenglicol. También son posibles otros enlazadores, tal como se muestra en los conjugados y compuestos descritos con más detalle a continuación.

En algunas modalidades, L^A es un primer enlazador descrito por la fórmula:



en donde cada uno de L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , L^5 y L^6 es independientemente una unidad de enlazador, y cada uno de a, b, c, d, e y f es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de a, b, c, d, e y f sea 1.

En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 1 to 6. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 1. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 2. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 3. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 4. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 5. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 6. En determinadas modalidades, cada uno de a, b, c, d, e y f es 1. En determinadas modalidades, cada uno de a, b, c, d y e es 1 y f es 0. En determinadas modalidades, cada uno de a, b, c y d es 1 y cada uno de e y f es 0. En determinadas modalidades, cada uno de a, b y c es 1 y cada uno de d, e y f es 0. En determinadas modalidades, cada uno de a y b es 1 y cada uno de c, d, e y f es 0. En determinadas modalidades, a es 1 y cada uno de b, c, d, e y f es 0.

En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^1 está unida al resto de conjugación de hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridino (por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anteriormente). En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^2 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo W^1 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^3 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo W^1 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^4 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo W^1 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^5 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo W^1 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^6 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo W^1 .

Puede usarse cualquier subunidad de enlazador conveniente en el primer enlazador L^A . Las subunidades de enlazador de interés incluyen, de modo no taxativo, unidades de polímeros tales como polietilenglicoles, polietilenos y poliacrilatos, residuos de aminoácidos, polímeros a base

de carbohidratos o residuos de carbohidratos y derivados de estos, polinucleótidos, grupos alquilo, grupos arilo, grupos heterocíclicos, combinaciones de estos y versiones sustituidas de estos. En algunas modalidades, cada uno de L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , L^5 y L^6 (si está presente) comprende uno o más grupos seleccionados independientemente de un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido y una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que incluye una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^1 (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^1 comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^1 comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^1 comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^1 comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^1 comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L^1 comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^2 (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^2 comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^2 comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^2 comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^2 comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^2 comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L^2 comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^3 (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^3 comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^3 comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^3 comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^3 comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^3 comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L^3 comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^4 (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^4 comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^4 comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^4 comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^4 comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^4 comprende un grupo arilo o un grupo

arilo sustituido. En algunas modalidades, L^4 comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^5 (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^5 comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^5 comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^5 comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^5 comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^5 comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L^5 comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^6 (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^6 comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^6 comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^6 comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^6 comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^6 comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L^6 comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^A es un primer enlazador que comprende

$-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-(L^5)_e-(L^6)_f$, donde:

$-(L^1)_a$ es $-(T^1-V^1)_a$;

$-(L^2)_b$ es $-(T^2-V^2)_b$;

$-(L^3)_c$ es $-(T^3-V^3)_c$;

$-(L^4)_d$ es $-(T^4-V^4)_d$;

$-(L^5)_e$ es $-(T^5-V^5)_e$; y

$-(L^6)_f$ es $-(T^6-V^6)_f$,

en donde T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 y T^6 , si están presentes, son grupos de enlace;

V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 y V^6 , si están presentes, son enlaces covalentes o grupos funcionales de enlace; y

cada uno de a, b, c, d, e y f es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de a, b, c, d, e y f sea 1.

En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 1 to 6. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 1. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 2. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 3. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 4. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 5. En determinadas modalidades, la suma de a, b, c, d, e y f es 6. En determinadas modalidades, cada uno de a, b, c, d, e y f es 1. En determinadas modalidades, cada uno de a, b,

c, d y e es 1 y f es 0. En determinadas modalidades, cada uno de a, b, c y d es 1 y cada uno de e y f es 0. En determinadas modalidades, cada uno de a, b y c es 1 y cada uno de d, e y f es 0. En determinadas modalidades, cada uno de a y b es 1 y cada uno de c, d, e y f es 0. En determinadas modalidades, a es 1 y cada uno de b, c, d, e y f es 0.

Tal como se describió anteriormente, en determinadas modalidades, L^1 se une al resto de conjugación de hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo (por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anteriormente). Como tal, en determinadas modalidades, T^1 se une al resto de conjugación de hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo (por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anteriormente). En determinadas modalidades, V^1 está unido al primer fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^2 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^2 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo, o V^2 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^3 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^3 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo, o V^3 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^4 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^4 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo, o V^4 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^5 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^5 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo, o V^5 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^6 , si está presente, está unida al primer fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^6 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo, o V^6 , si está presente, está unido al primer fármaco o agente activo.

En determinadas modalidades, el conjugado con la Fórmula (I) incluye un segundo enlazador, L^B . El segundo enlazador, L^B , puede utilizarse para unir un segundo resto de interés (por ejemplo, un segundo fármaco o agente activo) a un anticuerpo contra TF a través de un resto de conjugación. El segundo enlazador, L^B , puede estar unido (por ejemplo, unido covalentemente) al resto de conjugación (por ejemplo, tal como se describe en la presente). Por ejemplo, el segundo enlazador, L^B , puede unir un resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo a un segundo fármaco. El resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo puede utilizarse para conjugar el segundo enlazador, L^B , (y, por lo tanto, el segundo fármaco) a un anticuerpo contra TF.

Por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anterior, L^B está unido a Ab a través de un resto de conjugación y, por lo tanto, Ab está unido indirectamente al segundo enlazador L^B a través del resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo. Tal como se describió anteriormente, Ab es un anticuerpo contra TF y, por lo tanto, L^B está unido a través del

resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo al anticuerpo contra TF, por ejemplo, el enlazador L^B está unido indirectamente al anticuerpo contra TF a través del resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo.

Se puede utilizar cualquier enlazador conveniente para el segundo enlazador L^B en los conjugados y compuestos en cuestión. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo seleccionado de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, acilamino, alquilamida, alquilamida sustituida, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo alquilo o alquilo sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo alquenilo o alquenilo sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo alquinilo o alquinilo sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo carboxilo o éster carboxílico sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo acilamino. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo arilo o arilo sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo heteroarilo o heteroarilo sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo cicloalquilo o cicloalquilo sustituido. En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un grupo heterociclilo o heterociclilo sustituido.

En determinadas modalidades, el segundo enlazador L^B puede incluir un polímero. Por ejemplo, el polímero puede incluir un polialquilenglicol y derivados de este, incluidos polietilenglicol, metoxipolietilenglicol, homopolímeros de polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de etilenglicol con propilenglicol (por ejemplo, donde los homopolímeros y copolímeros no se sustituyen o se sustituyen en un extremo con un grupo alquilo), alcohol polivinílico, éteres de polivinil etilo, polivinilpirrolidona, combinaciones de estos, y similares. En determinadas modalidades, el polímero es un polialquilenglicol. En determinadas modalidades, el polímero es un polietilenglicol. También son posibles otros enlazadores, tal como se muestra en los conjugados y compuestos descritos con más detalle a continuación.

En algunas modalidades, L^B es un segundo enlazador descrito por la fórmula:

$$-(L^7)_g-(L^8)_h-(L^9)_i-(L^{10})_j-(L^{11})_k-(L^{12})_l-(L^{13})_m,$$

en donde cada uno de L⁷, L⁸, L⁹, L¹⁰, L¹¹, L¹² y L¹³ es independientemente una unidad de enlazador, y cada uno de g, h, i, j, k, l y m es independientemente 0 o 1, siempre que al menos

uno de g, h, i, j, k, l y m sea 1.

En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 1 to 7. En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 1. En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 2. En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 3. En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 4. En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 5. En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 6. En determinadas modalidades, la suma de g, h, i, j, k, l y m es 7. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i, j, k, l y m es 1. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i, j, k y l es 1 y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i, j y k es 1 y cada uno de l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i y j es 1 y cada uno de k, l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, e i es 1 y cada uno de j, k, l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g y h es 1 y cada uno de i, j, k, l y m es 0. En determinadas modalidades, g es 1 y cada uno de h, i, j, k, l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i, j, k, l y m es 0.

En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^7 está unida al resto de conjugación de hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridino (por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anteriormente). En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^8 , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo W^2 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^9 , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo W^2 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^{10} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo W^2 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^{11} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo W^2 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^{12} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo W^2 . En determinadas modalidades, la subunidad de enlazador L^{13} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo W^2 .

Cualquier subunidad de enlace conveniente se puede utilizar en el segundo enlace L^B . Las subunidades de enlazador de interés incluyen, de modo no taxativo, unidades de polímeros tales como polietilenglicoles, polietilenos y poliacrilatos, residuos de aminoácidos, polímeros a base de carbohidratos o residuos de carbohidratos y derivados de estos, polinucleótidos, grupos alquilo, grupos arilo, grupos heterocíclicos, combinaciones de estos y versiones sustituidas de estos. En algunas modalidades, cada uno de L^7 , L^8 , L^9 , L^{10} , L^{11} , L^{12} y L^{13} (si está presente) comprende uno o más grupos seleccionados independientemente de un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido y una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que incluye una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^7 (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un

grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L⁷ comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L⁷ comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L⁷ comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L⁷ comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L⁷ comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L⁷ comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L⁸ (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L⁸ comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L⁸ comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L⁸ comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L⁸ comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L⁸ comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L⁸ comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L⁹ (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L⁹ comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L⁹ comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L⁹ comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L⁹ comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L⁹ comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L⁹ comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L¹⁰ (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L¹⁰ comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L¹⁰ comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L¹⁰ comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L¹⁰ comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L¹⁰ comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L¹⁰ comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L¹¹ (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L¹¹ comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L¹¹ comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L¹¹ comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L¹¹ comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L¹¹ comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L¹¹ comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de

enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^{12} (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^{12} comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^{12} comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^{12} comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^{12} comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^{12} comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L^{12} comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^{13} (si está presente) comprende un polietilenglicol, un polietilenglicol modificado, un residuo de aminoácido, un grupo alquilo, un alquilo sustituido, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido o una diamina. En algunas modalidades, L^{13} comprende un polietilenglicol. En algunas modalidades, L^{13} comprende un polietilenglicol modificado. En algunas modalidades, L^{13} comprende un residuo de aminoácido. En algunas modalidades, L^{13} comprende un grupo alquilo o un alquilo sustituido. En algunas modalidades, L^{13} comprende un grupo arilo o un grupo arilo sustituido. En algunas modalidades, L^{13} comprende una diamina (por ejemplo, un grupo de enlace que comprende una alquilendiamina).

En algunas modalidades, L^B es un segundo enlazador que comprende

$$-(L^7)_g-(L^8)_h-(L^9)_i-(L^{10})_j-(L^{11})_k-(L^{12})_l-(L^{13})_m-, \text{ donde:}$$

$$-(L^7)_g- \text{ es } -(T^7-V^7)_g-;$$

$$-(L^8)_h- \text{ es } -(T^8-V^8)_h-;$$

$$-(L^9)_i- \text{ es } -(T^9-V^9)_i-;$$

$$-(L^{10})_j- \text{ es } -(T^{10}-V^{10})_j-;$$

$$-(L^{11})_k- \text{ es } -(T^{11}-V^{11})_k-;$$

$$-(L^{12})_l- \text{ es } -(T^{12}-V^{12})_l-; \text{ y}$$

$$-(L^{13})_m- \text{ es } -(T^{13}-V^{13})_m-,$$

en donde T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} , si están presentes, son grupos de enlace;

V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} , si están presentes, son enlaces covalentes o grupos funcionales de enlace; y

cada uno de g , h , i , j , k , l y m es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de g , h , i , j , k , l y m sea 1.

En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 1 to 7. En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 1. En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 2. En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 3. En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 4. En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 5. En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 6. En determinadas modalidades, la suma de g , h , i , j , k , l y m es 7. En determinadas modalidades, cada uno de g , h ,

i, j, k, l y m es 1. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i, j, k y l es 1 y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i, j y k es 1 y cada uno de l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i y j es 1 y cada uno de k, l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, e i es 1 y cada uno de j, k, l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g y h es 1 y cada uno de i, j, k, l y m es 0. En determinadas modalidades, g es 1 y cada uno de h, i, j, k, l y m es 0. En determinadas modalidades, cada uno de g, h, i, j, k, l y m es 0.

Tal como se describió anteriormente, en determinadas modalidades, L^7 se une al resto de conjugación de hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo (por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anteriormente). Como tal, en determinadas modalidades, T^7 se une al resto de conjugación de hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrolo-piridinilo (por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula (I) anteriormente). En determinadas modalidades, V^7 está unido al segundo fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^8 , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^8 , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo, o V^8 , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^9 , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^9 , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo, o V^9 , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^{10} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^{10} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo, o V^{10} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^{11} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^{11} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo, o V^{11} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^{12} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^{12} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo, o V^{12} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo. En determinadas modalidades, L^{13} , si está presente, está unida al segundo fármaco o agente activo. Como tal, en determinadas modalidades, T^{13} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo, o V^{13} , si está presente, está unido al segundo fármaco o agente activo.

Con respecto a los grupos de enlace, T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} , puede usarse cualquier grupo de enlace conveniente en los enlazadores en cuestión. En algunas modalidades, cada uno de T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} comprende uno o más grupos seleccionados independientemente de un enlace covalente, un alquilo (C_1 - C_{12}), un alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, $(AA)_p$, $-(CR^{13}OH)_x$ -

, 4-amino-piperidina (4AP), meta-amino-benciloxi (MABO), meta-amino-benciloxicarbonilo (MABC), para-amino-benciloxi (PABO), para-amino-benciloxicarbonilo (PABC), para-aminobencilo (PAB), para-amino-bencilamino (PABA), para-amino-fenilo (PAP), para-hidroxifenilo (PHP), un grupo acetal, una hidrazina, un disulfuro, y un éster, donde cada w es un número entero de 1 a 20, cada n es un número entero de 1 a 30, cada p es un número entero de 1 a 20, y cada x es un número entero de 1 a 12.

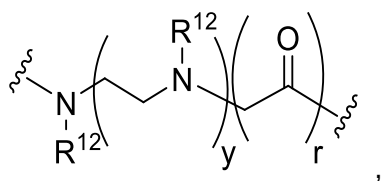
En determinadas modalidades, el grupo de enlace (por ejemplo, T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y/o T^{13}) incluye un alquilo (C_1 - C_{12}) o un alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido. En determinadas modalidades, el alquilo (C_1 - C_{12}) es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que incluye de 1 a 12 átomos de carbono, tales como de 1 a 10 átomos de carbono, o de 1 a 8 átomos de carbono, o de 1 a 6 átomos de carbono, o de 1 a 5 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono. En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) puede ser un alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C_1 - C_{12} , o alquilo C_1 - C_{10} , o alquilo C_1 - C_6 , o alquilo C_1 - C_3 . En algunos casos, alquilo (C_1 - C_{12}) es un alquilo C_2 . Por ejemplo, el alquilo (C_1 - C_{12}) puede ser un alquileno o alquileno sustituido, tal como alquileno C_1 - C_{12} , o alquileno C_1 - C_{10} , o alquileno C_1 - C_6 , o alquileno C_1 - C_3 . En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) es un alquileno C_1 (por ejemplo, CH_2). En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) es un alquileno C_2 (por ejemplo, CH_2CH_2). En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) es un alquileno C_3 (por ejemplo, $CH_2CH_2CH_2$).

En determinadas modalidades, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido es un grupo alquilo sustituido de cadena lineal o ramificada que incluye de 1 a 12 átomos de carbono, tales como de 1 a 10 átomos de carbono, o de 1 a 8 átomos de carbono, o de 1 a 6 átomos de carbono, o de 1 a 5 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono. En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido puede ser un alquilo sustituido, tal como alquilo C_1 - C_{12} sustituido, o alquilo C_1 - C_{10} sustituido, o alquilo C_1 - C_6 sustituido, o alquilo C_1 - C_3 sustituido. En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido es un alquilo C_2 sustituido. Por ejemplo, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido puede ser un alquileno sustituido, tal como alquileno C_1 - C_{12} sustituido, o alquileno C_1 - C_{10} sustituido, o alquileno C_1 - C_6 sustituido, o alquileno C_1 - C_3 sustituido. En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido es un alquileno- C_1 sustituido (por ejemplo, alquileno- C_1 sustituido con $-SO_3H$). En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido es un alquileno C_2 sustituido. En algunos casos, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido es un alquileno C_3 sustituido. Por ejemplo, el alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido puede incluir alquileno C_1 - C_{12} (por ejemplo, alquileno- C_3 o alquileno- C_5) sustituido con un grupo $(PEG)_k$, tal como se describe en la presente (por ejemplo, $-CONH(PEG)_k$, tal como $-CONH(PEG)_3$ o $-CONH(PEG)_5$; o $-NHCO(PEG)_k$, tal como $-NHCO(PEG)_7$), o puede incluir alquileno C_1 - C_{12} (por ejemplo, alquileno- C_3) sustituido con un grupo $-CONHCH_2CH_2SO_3H$, o puede incluir alquileno C_1 - C_{12} (por ejemplo, alquileno- C_5) sustituido con un grupo $-NHCOCH_2SO_3H$.

En determinadas modalidades, el grupo de enlace (por ejemplo, T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 ,

T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido. En algunos casos, el grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un arilo o arilo sustituido. Por ejemplo, el arilo puede ser fenilo. En algunos casos, el arilo sustituido es un fenilo sustituido. El fenilo sustituido puede sustituirse con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo (C₁-C₁₂), alquilo (C₁-C₁₂) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En algunos casos, el arilo sustituido es un fenilo sustituido, donde el sustituyente incluye un resto escindible, tal como se describe en la presente (por ejemplo, un resto enzimáticamente escindible, tal como un glicósido o derivado de glicósido).

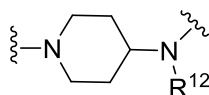
En algunos casos, el grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como triazolilo (por ejemplo, 1,2,3-triazolilo). En algunos casos, el grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un cicloalquilo o cicloalquilo sustituido. En algunos casos, el grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un heterociclilo o heterociclilo sustituido. En algunos casos, el sustituyente en el heteroarilo sustituido, cicloalquilo sustituido o heterociclilo sustituido incluye un resto escindible, tal como se describe en la presente (por ejemplo, un resto enzimáticamente escindible, tal como un glicósido o derivado de glicósido). En determinadas modalidades, el grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un resto etilendiamina (EDA), por ejemplo, un grupo de enlace que contiene EDA. En determinadas modalidades, (EDA)_w incluye uno o más restos de EDA, tal como donde w es un número entero de 1 a 50, tal como de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 12 o de 1 a 6, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Los restos de etilendiamina (EDA) unidos pueden sustituirse opcionalmente en una o más posiciones convenientes con cualquier sustituyente conveniente, por ejemplo, con un alquilo, un alquilo sustituido, un acilo, un acilo sustituido, un arilo o un arilo sustituido. En determinadas modalidades, el resto de EDA se describe mediante la estructura:



donde y es un número entero de 1 a 6, r es 0 o 1; y cada R¹² se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En determinadas modalidades, y es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En determinadas modalidades, y es 1 y r es 0. En determinadas modalidades, y es 1 y r es

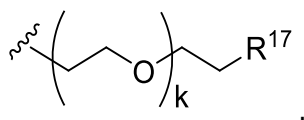
1. En determinadas modalidades, y es 2 y r es 0. En determinadas modalidades, y es 2 y r es 1. En determinadas modalidades, cada R^{12} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un arilo y un arilo sustituido. En determinadas modalidades, dos grupos R^{12} adyacentes de EDA pueden estar enlazados de forma cíclica, por ejemplo, para formar un anillo de piperazinilo. En determinadas modalidades, y es 1 y los dos grupos R^{12} adyacentes son un grupo alquilo, enlazados de forma cíclica para formar un anillo piperazinilo. En determinadas modalidades, y es 1 y los grupos R^{12} adyacentes se seleccionan de hidrógeno, un alquilo (por ejemplo, metilo) y un alquilo sustituido (por ejemplo, alquilo inferior-OH, tal como etil-OH o propil-OH).

En determinadas modalidades, el grupo de enlace (por ejemplo, T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y/o T^{13}) incluye un resto de 4-amino-piperidina (4AP) (también mencionado en la presente como piperidin-4-amino, P4A). El resto de 4AP puede sustituirse opcionalmente en una o más posiciones convenientes con cualquier sustituyente conveniente, por ejemplo, con un alquilo, un alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol, un acilo, un acilo sustituido, un arilo o un arilo sustituido. En determinadas modalidades, el resto de 4AP se describe mediante la estructura:



donde R^{12} se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol (por ejemplo, un polietilenglicol o un polietilenglicol modificado), alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En determinadas modalidades, R^{12} es un resto de polietilenglicol. En determinadas modalidades, R^{12} es un polietilenglicol modificado en carboxi.

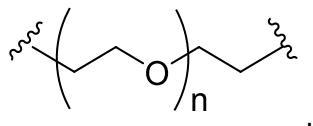
En determinadas modalidades, R^{12} incluye un resto de polietilenglicol descrito mediante la fórmula: $(\text{PEG})_k$, que puede estar representado por la estructura:



donde k es un número entero de 1 a 20, tal como de 1 a 18, o de 1 a 16, o de 1 a 14, o de 1 a 12, o de 1 a 10, o de 1 a 8, o de 1 a 6, o de 1 a 4, o 1 o 2, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En algunos casos, k es 2. En determinadas modalidades, R^{17} se selecciona de OH, COOH, OR o COOR, donde R se selecciona de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En

determinadas modalidades, R^{17} es COOH . En determinadas modalidades, R^{17} es OH . En determinadas modalidades, R^{17} es OCH_3 .

En determinadas modalidades, un grupo de enlace (por ejemplo, T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y/o T^{13}) incluye $(\text{PEG})_n$, donde $(\text{PEG})_n$ es un polietilenglicol o una unidad de enlazador de polietilenglicol modificado. En determinadas modalidades, $(\text{PEG})_n$ se describe mediante la estructura:



donde n es un número entero de 1 a 50, tal como de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 12 o de 1 a 6, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En algunos casos, n es 2. En algunos casos, n es 3. En algunos casos, n es 6. En algunos casos, n es 12.

En determinadas modalidades, un grupo de enlace (por ejemplo, T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y/o T^{13}) incluye $(\text{AA})_p$, donde AA es un residuo de aminoácido. Puede utilizarse cualquier aminoácido conveniente. Los aminoácidos de interés incluyen, de modo no taxativo, los aminoácidos L y D, aminoácidos naturales, tales como cualquiera de los 20 alfa-aminoácidos primarios y beta-alanina, aminoácidos no naturales (por ejemplo, análogos de aminoácidos), tal como un alfa-aminoácido no natural o un beta-aminoácido no natural, etc. En determinadas modalidades, p es un número entero de 1 a 50, tal como de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 12 o de 1 a 6, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En determinadas modalidades, p es 1. En determinadas modalidades, p es 2.

En determinadas modalidades, un grupo de enlace (por ejemplo, T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y/o T^{13}) incluye un análogo de aminoácido. Los análogos de aminoácidos incluyen compuestos similares a los aminoácidos que tienen estructura y/o forma general similar a uno o más aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas naturales (por ejemplo, Ala o A, Cys o C, Asp o D, Glu o E, Phe o F, Gly o G, His o H, Ile o I, Lys o K, Leu o L, Met o M, Asn o N, Pro o P, Gln o Q, Arg o R, Ser o S, Thr o T, Val o V, Trp o W, Tyr o Y). Los análogos de aminoácidos también incluyen aminoácidos naturales con cadenas laterales o estructuras principales modificadas. Los análogos de aminoácido también incluyen análogos de aminoácidos con la misma estereoquímica que en la forma D de origen natural, así como la forma L de análogos de aminoácidos. En algunos casos, los análogos de aminoácidos comparten las estructuras de estructura principal, y/o las estructuras de cadena lateral de uno o más aminoácidos naturales, donde la diferencia es uno o más grupos modificados en la molécula. Dicha modificación puede incluir, de modo no taxativo, la sustitución de un átomo (tal como N) por un átomo relacionado (tal como S), la adición de un grupo (tal como metilo, o hidroxilo, etc.) o un átomo (tal como Cl o Br, etc.), eliminación de un grupo, sustitución de un enlace covalente (enlace simple por enlace doble, etc.), o combinaciones de estos. Por ejemplo, los análogos de

aminoácidos pueden incluir α -hidroxiácidos, y α -aminoácidos, y similares. Los ejemplos de análogos de aminoácidos incluyen, de modo no taxativo, sulfoalanina y similares.

En determinadas modalidades, un grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un resto descrito por la fórmula $-(CR^{13}OH)_x$, donde x es 0 o x es un número entero de 1 a 50, tal como de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 12 o de 1 a 6, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. En determinadas modalidades, x es 1. En determinadas modalidades, x es 2. En determinadas modalidades, R¹³ se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es hidrógeno. En determinadas modalidades, R¹³ es alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido, alquilo C₁₋₄ o alquilo C₁₋₄ sustituido, alquilo C₁₋₃ o alquilo C₁₋₃ sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es alqueno o alqueno sustituido, tal como alqueno C₂₋₆ o alqueno C₂₋₆ sustituido, o alqueno C₂₋₄ o alqueno C₂₋₄ sustituido, o alqueno C₂₋₃ o alqueno C₂₋₃ sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es alquino o alquino sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es carboxilo o éster de carboxilo. En determinadas modalidades, R¹³ es acilo o aciloxi. En determinadas modalidades, R¹³ es acilamino o aminoacilo. En determinadas modalidades, R¹³ es alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, R¹³ es sulfonilo. En determinadas modalidades, R¹³ es tioalcoxi o tioalcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es arilo o arilo sustituido, tal como arilo C₅₋₈ o arilo C₅₋₈ sustituido, tal como arilo C₅ o el arilo C₅ sustituido, o arilo C₆ o arilo C₆ sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como heteroarilo C₅₋₈ o heteroarilo C₅₋₈ sustituido, tal como heteroarilo C₅ o heteroarilo C₅ sustituido, o heteroarilo C₆ o heteroarilo C₆ sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, tal como cicloalquilo C₃₋₈ o cicloalquilo C₃₋₈ sustituido, tal como cicloalquilo C₃₋₆ o cicloalquilo C₃₋₆ sustituido, o cicloalquilo C₃₋₅ o cicloalquilo C₃₋₅ sustituido. En determinadas modalidades, R¹³ es heterociclilo o heterociclilo sustituido, tal como heterociclilo C₃₋₈ o heterociclilo C₃₋₈ sustituido, tal como heterociclilo C₃₋₆ o heterociclilo C₃₋₆ sustituido, o heterociclilo C₃₋₅ o heterociclilo C₃₋₅ sustituido.

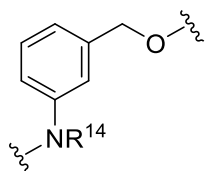
En determinadas modalidades, R¹³ se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido. En estas modalidades, el alquilo, el alquilo sustituido, el arilo y el arilo sustituido son tal como se describieron anteriormente para R¹³.

En determinadas modalidades, el grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un grupo acetal, un disulfuro, una hidrazina, o un éster. En algunas

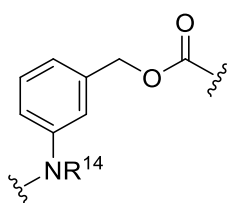
modalidades, el grupo de enlace incluye un grupo acetal. En algunas modalidades, el grupo de enlace incluye una hidrazina. En algunas modalidades, el grupo de enlace incluye un disulfuro. En algunas modalidades, el grupo de enlace incluye un éster.

En determinadas modalidades, un grupo de enlace (por ejemplo, T¹, T², T³, T⁴, T⁵, T⁶, T⁷, T⁸, T⁹, T¹⁰, T¹¹, T¹² y/o T¹³) incluye un meta-amino-benciloxi (MABO), meta-amino-benciloxycarbonilo (MABC), para-amino-benciloxi (PABO), para-amino-benciloxycarbonilo (PABC), para-aminobencilo (PAB), para-amino-bencilamino (PABA), para-amino-fenilo (PAP) o para-hidroxi-fenilo (PHP).

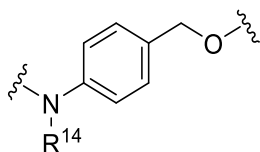
En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo MABO descrito por la siguiente estructura:



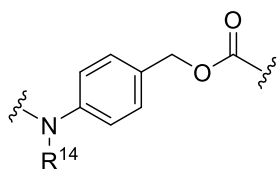
En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo MABC descrito por la siguiente estructura:



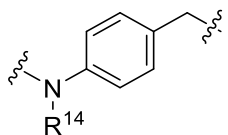
En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo PABO descrito por la siguiente estructura:



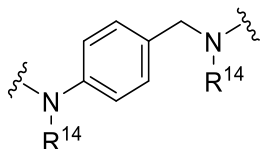
En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo PABC descrito por la siguiente estructura:



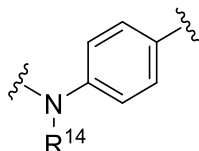
En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo PAB descrito por la siguiente estructura:



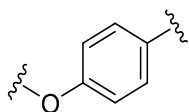
En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo PABA descrito por la siguiente estructura:



En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo PAP descrito por la siguiente estructura:



En algunas modalidades, un grupo de unión incluye un grupo PHP descrito por la siguiente estructura:



En determinadas modalidades, cada R^{14} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

En determinadas modalidades, R^{14} es hidrógeno. En determinadas modalidades, cada R^{14} es hidrógeno. En determinadas modalidades, R^{14} es alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido, alquilo C_{1-4} o alquilo C_{1-4} sustituido, alquilo C_{1-3} o alquilo C_{1-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es alquenilo o alquenilo sustituido, tal como alquenilo C_{2-6} o alquenilo C_{2-6} sustituido, o alquenilo C_{2-4} o alquenilo C_{2-4} sustituido, o alquenilo C_{2-3} o alquenilo C_{2-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es alquinilo o alquinilo sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es carboxilo o éster de carboxilo. En determinadas modalidades, R^{14} es acilo o aciloxi. En determinadas modalidades, R^{14} es acilamino o aminoacilo. En determinadas modalidades, R^{14} es alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, R^{14} es sulfonilo. En determinadas modalidades, R^{14} es tioalcoxi o tioalcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es arilo o arilo sustituido, tal como arilo C_{5-8} o arilo C_{5-8} sustituido, tal como arilo C_5 o el arilo C_5 sustituido, o arilo C_6 o arilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como heteroarilo C_{5-8} o heteroarilo C_{5-8} sustituido, tal como heteroarilo C_5 o heteroarilo C_5 sustituido, o

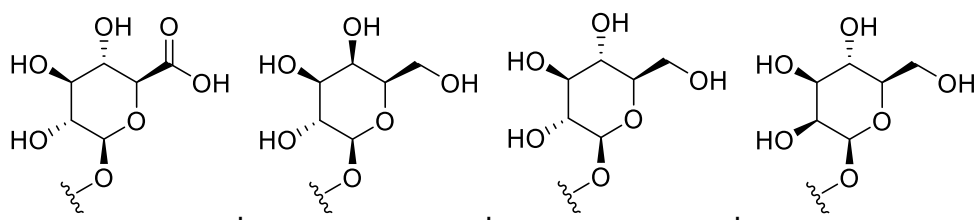
heteroarilo C_6 o heteroarilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-8} o cicloalquilo C_{3-8} sustituido, tal como cicloalquilo C_{3-6} o cicloalquilo C_{3-6} sustituido, o cicloalquilo C_{3-5} o cicloalquilo C_{3-5} sustituido. En determinadas modalidades, R^{14} es heterociclilo o heterociclilo sustituido, tal como heterociclilo C_{3-8} o heterociclilo C_{3-8} sustituido, tal como heterociclilo C_{3-6} o heterociclilo C_{3-6} sustituido, o heterociclilo C_{3-5} o heterociclilo C_{3-5} sustituido.

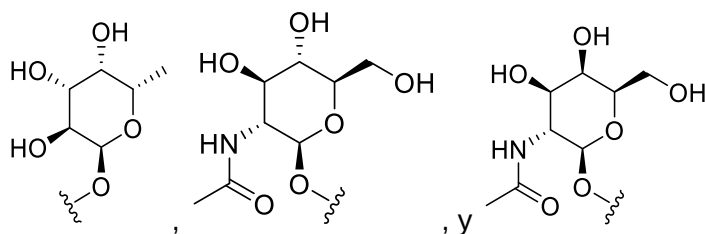
En algunas modalidades de las estructuras de enlace MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP y PHP que se mostraron anteriormente, el anillo fenilo puede estar sustituido con uno o más grupos adicionales seleccionados de halógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

En determinadas modalidades, cada uno de los uno o más grupos de enlace T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y/o T^{13} está sustituido con un glicósido o derivado de glicósido. Por ejemplo, en algunos casos, cada uno de T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 y T^6 está opcionalmente sustituido con un glicósido. En algunos casos, cada uno de T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} está opcionalmente sustituido con un glicósido. En determinadas modalidades, el glicósido o derivado de glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En determinadas modalidades, las estructuras de unión de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, y PHP que se mostraron anteriormente pueden estar sustituidas con uno o más grupos adicionales seleccionados de un glicósido y un derivado de glicósido. Por ejemplo, en algunas modalidades de las estructuras de unión de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, y PHP que se mostraron anteriormente, el anillo fenilo puede estar sustituido con uno o más grupos adicionales seleccionados de un glicósido y un derivado de glicósido. En determinadas modalidades, el glicósido o derivado de glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc. En algunas modalidades, PABC se sustituye con un glicósido, por ejemplo, un hidrógeno de PABC se reemplaza con un glicósido, tal como un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

Por ejemplo, en algunas modalidades, el glicósido o derivado de glicósido puede seleccionarse de las siguientes estructuras:





Respecto a lo grupos funcionales de enlace, V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 , V^6 , V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} , puede usarse cualquier grupo funcional de enlace en los enlazadores en cuestión. Los grupos funcionales de enlace de interés incluyen, de modo no taxativo, amino, carbonilo, amido, oxycarbilo, carboxi, sulfonilo, sulfóxido, sulfoniloamino, aminosulfonilo, tio, oxi, fosfo, fosforamidato, tiofosforamidato, y similares. En algunas modalidades, cada uno de V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 , V^6 , V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} se selecciona independientemente de un enlace covalente, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ y $-P(O)OH-$, donde q es un número entero de 1 a 6. En determinadas modalidades, q es un número entero de 1 a 6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6). En determinadas modalidades, q es 1. En determinadas modalidades, q es 2. En determinadas modalidades, q es 3. En determinadas modalidades, q es 4. En determinadas modalidades, q es 5. En determinadas modalidades, q es 6.

En algunas modalidades, cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

En determinadas modalidades, R^{15} es hidrógeno. En determinadas modalidades, cada R^{15} es hidrógeno. En determinadas modalidades, R^{15} es alquilo o alquilo sustituido, tal como alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido, alquilo C_{1-4} o alquilo C_{1-4} sustituido, alquilo C_{1-3} o alquilo C_{1-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^{15} es alquenilo o alquenilo sustituido, tal como alquenilo C_{2-6} o alquenilo C_{2-6} sustituido, o alquenilo C_{2-4} o alquenilo C_{2-4} sustituido, o alquenilo C_{2-3} o alquenilo C_{2-3} sustituido. En determinadas modalidades, R^{15} es alquinilo o alquinilo sustituido. En determinadas modalidades, R^{15} es alcoxi o alcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^{15} es amino o amino sustituido. En determinadas modalidades, R^{15} es carboxilo o éster de carboxilo. En determinadas modalidades, R^{15} es acilo o aciloxi. En determinadas modalidades, R^{15} es acilamino o aminoacilo. En determinadas modalidades, R^{15} es alquilamida o alquilamida sustituida. En determinadas modalidades, R^{15} es sulfonilo. En determinadas modalidades, R^{15} es tioalcoxi o tioalcoxi sustituido. En determinadas modalidades, R^{15} es arilo o arilo sustituido, tal como arilo C_{5-8} o arilo C_{5-8} sustituido, tal como arilo C_5 o el arilo C_5 sustituido, o arilo C_6 o arilo C_6 sustituido. En determinadas modalidades, R^{15} es heteroarilo o heteroarilo sustituido, tal como

heteroarilo C₅₋₈ o heteroarilo C₅₋₈ sustituido, tal como heteroarilo C₅ o heteroarilo C₅ sustituido, o heteroarilo C₆ o heteroarilo C₆ sustituido. En determinadas modalidades, R¹⁵ es cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, tal como cicloalquilo C₃₋₈ o cicloalquilo C₃₋₈ sustituido, tal como cicloalquilo C₃₋₆ o cicloalquilo C₃₋₆ sustituido, o cicloalquilo C₃₋₅ o cicloalquilo C₃₋₅ sustituido. En determinadas modalidades, R¹⁵ es heterociclilo o heterociclilo sustituido, tal como heterociclilo C₃₋₈ o heterociclilo C₃₋₈ sustituido, tal como heterociclilo C₃₋₆ o heterociclilo C₃₋₆ sustituido, o heterociclilo C₃₋₅ o heterociclilo C₃₋₅ sustituido.

En determinadas modalidades, cada R¹⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En estas modalidades, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido son tal como se describió anteriormente para R¹⁵. Tal como se describió anteriormente, en algunas modalidades, L^A es un primer enlazador que comprende -(T¹-V¹)_a-(T²-V²)_b-(T³-V³)_c-(T⁴-V⁴)_d-(T⁵-V⁵)_e-(T⁶-V⁶)_f, donde cada uno de a, b, c, d, e y f es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de a, b, c, d, e, y f sea 1.

En algunas modalidades, en el primer enlazador L^A:

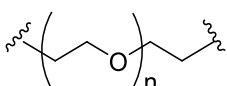
T¹ se selecciona de un alquilo (C₁-C₁₂) y un alquilo (C₁-C₁₂) sustituido;

cada uno de T², T³, T⁴, T⁵ y T⁶ se selecciona independientemente de alquilo (C₁-C₁₂), alquilo (C₁-C₁₂) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, (EDA)_w, (PEG)_n, (AA)_p, -(CR¹³OH)_x-, 4-amino-piperidina (4AP), MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, PHP, un grupo acetal, un disulfuro, una hidrazina y un éster; y

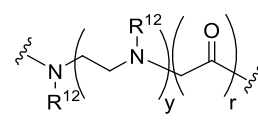
cada uno de V¹, V², V³, V⁴, V⁵ y V⁶ se selecciona independientemente de un enlace covalente,

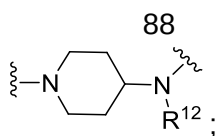
-CO-, -NR¹⁵-, -NR¹⁵(CH₂)_q-, -NR¹⁵(C₆H₄)-, -CONR¹⁵-, -NR¹⁵CO-, -C(O)O-, -OC(O)-, -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂NR¹⁵-, -NR¹⁵SO₂- y -P(O)OH-, en donde q es un número entero de 1 a 6;

en donde:

(PEG)_n es , donde n es un número entero de 1 a 30;

EDA es un resto de etilendiamina que tiene la siguiente estructura:

, donde y es un número entero de 1 a 6 y r es 0 o 1;



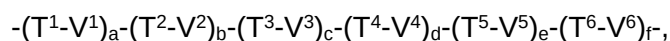
4-amino-piperidina (4AP) es

AA es un residuo de aminoácido, donde p es un número entero de 1 a 20; y cada R^{12} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol, un arilo y un arilo sustituido, en donde cualesquiera dos grupos R^{12} adyacentes pueden enlazarse de forma cíclica para formar un anillo piperazinilo;

cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido; y

cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

En algunas modalidades, L^A comprende:



en donde

cada uno de a, b, c, d, e y f es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de a, b, c, d, e y f sea 1;

cada uno de T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 y T^6 se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C_1 - C_{12}), alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, (EDA)_w, (PEG)_n, (AA)_p, $-(CR^{13}OH)_x$, 4-amino-piperidina (4AP), meta-amino-benciloxi (MABO), meta-amino-benciloxicarbonilo (MABC), para-amino-benciloxi (PABO), para-amino-benciloxicarbonilo (PABC), para-aminobencilo (PAB), para-amino-bencilamino (PABA), para-amino-fenilo (PAP), para-hidroxi-fenilo (PHP), un grupo acetal, una hidrazina, un disulfuro, y un éster, en donde EDA es un resto etilenodiamina, PEG es un polietilenglicol, y AA es un residuo de aminoácidos o un análogo de aminoácidos, en donde cada w es un número entero de 1 a 20, cada n es un número entero de 1 a 30, cada p es un número entero de 1 a 20, y cada x es un número entero de 1 a 12;

cada uno de V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 y V^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ y $-P(O)OH-$, en donde cada q es un número entero de 1 a 6;

cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un arilo y un arilo sustituido; y

cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo,

acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

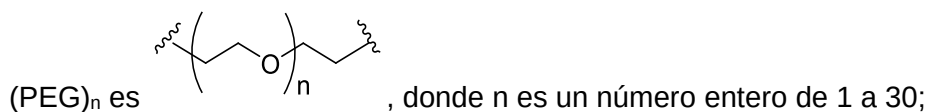
En algunas modalidades de L^A:

T¹ se selecciona de un alquilo (C₁-C₁₂) y un alquilo (C₁-C₁₂) sustituido;

cada uno de T², T³, T⁴, T⁵ y T⁶ se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C₁-C₁₂), alquilo (C₁-C₁₂) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, (EDA)_w, (PEG)_n, (AA)_p, - (CR¹³OH)_x-, 4-amino-piperidina (4AP), MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, PHP, un grupo acetal, una hidrazina y un éster; y

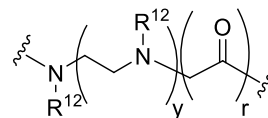
cada uno de V¹, V², V³, V⁴, V⁵ y V⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, -CO-, -NR¹⁵-, -NR¹⁵(CH₂)_q-, -NR¹⁵(C₆H₄)-, -CONR¹⁵-, -NR¹⁵CO-, -C(O)O-, -OC(O)-, -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂NR¹⁵-, -NR¹⁵SO₂- y -P(O)OH-;

en donde:

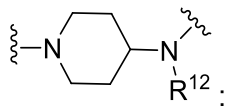


EDA es un resto de etilendiamina que tiene la siguiente estructura:

, donde y es un número entero de 1 a 6 y r es 0 o 1;



4-amino-piperidina (4AP) es



cada R¹² se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol, un arilo y un arilo sustituido, en donde cualesquiera dos grupos R¹² adyacentes pueden enlazarse de forma cíclica para formar un anillo piperazinilo;

cada uno de a, b, c y d es 1; y

e y f son 0.

En algunas modalidades, cada uno de T¹, T², T³, T⁴, T⁵ y T⁶ está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, cada uno de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP y PHP está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, el glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En determinadas modalidades, T¹, T², T³, T⁴, T⁵ y T⁶ y V¹, V², V³, V⁴, V⁵ y V⁶ se seleccionan de los siguientes:

en donde:

T¹ es alquilo (C₁-C₁₂) y V¹ es -CO-;

T^2 es $(AA)_p$ y V^2 está ausente;
 T^3 es PABC y V^3 está ausente;
 p es un número entero de 1 a 10; y
 cada uno de d , e y f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CONH-;
 T^2 es $(PEG)_n$ y V^2 es -CO-;
 T^3 es $(AA)_p$ y V^3 está ausente;
 T^4 es PABC y V^4 está ausente;
 p es un número entero de 1 a 10; y
 cada uno de e y f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CO-;
 T^2 es un análogo de aminoácido y V^2 es -NH-;
 T^3 es $(PEG)_n$ y V^3 es -CO-;
 T^4 es $(AA)_p$ y V^4 está ausente;
 T^5 es PABC y V^5 está ausente;
 p es un número entero de 1 a 10; y
 f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CONH-;
 T^2 es $(PEG)_n$ y V^2 es -CO-;
 T^3 es $(AA)_p$ y V^3 está ausente;
 T^4 es PABC y V^4 está ausente;
 p es un número entero de 1 a 10; y
 cada uno de e y f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CONH-;
 T^2 es alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido y V^2 es -CO-;
 T^3 es $(AA)_p$ y V^3 está ausente;
 T^4 es PABC y V^4 está ausente;
 p es un número entero de 1 a 10; y
 cada uno de e y f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CONH-;
 T^2 es $(PEG)_n$ y V^2 es -CO-;
 T^3 es $(AA)_p$ y V^3 está ausente;

T^4 es PABA y V^4 es -CO-;

T^5 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^5 está ausente;

p es un número entero de 1 a 10; y

f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CO-;

T^2 es 4AP y V^2 es -CO-;

T^3 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^3 es -CO-;

T^4 es $(AA)_p$ y V^4 está ausente;

T^5 es PABC y V^5 está ausente;

p es un número entero de 1 a 10; y

f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CO-;

T^2 es 4AP y V^2 es -CO-;

T^3 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^3 es -O-;

T^4 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^4 es -CO-;

T^5 es $(AA)_p$ y V^5 está ausente;

p es un número entero de 1 a 10; y

T^6 es PABC y V^6 está ausente; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CO-;

T^2 es un análogo de aminoácido y V^2 está ausente;

T^3 es $(AA)_p$ y V^3 está ausente;

T^4 es PABC y V^4 está ausente;

p es un número entero de 1 a 10; y

cada uno de e y f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CONH-;

T^2 es $(PEG)_n$ y V^2 es -CONH-;

T^3 es alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido y V^3 es -CO-;

T^4 es $(AA)_p$ y V^4 está ausente;

T^5 es PABC y V^5 está ausente;

p es un número entero de 1 a 10; y

f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^1 es -CO-;

T^2 es $(AA)_p$ y V^2 es $-NH-$;
 T^3 es $(PEG)_n$ y V^3 es $-CO-$;
 T^4 es $(AA)_p$ y V^4 está ausente;
 T^5 es PABC y V^5 está ausente;
 p es un número entero de 1 a 10; y
 f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^1 es $-CONH-$;
 T^2 es $(PEG)_n$ y V^2 es $-CO-$;
 T^3 es $(AA)_p$ y V^3 está ausente;
 T^4 es PAP y V^4 es $-C(O)O-$;

p es un número entero de 1 a 10; y
 cada uno de e y f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^1 es $-CONH-$;
 T^2 es alquilo (C_1-C_{12}) sustituido y V^2 es $-CO-$;
 T^3 es $(AA)_p$ y V^3 está ausente;
 T^4 es PABC y V^4 está ausente;

p es un número entero de 1 a 10; y
 cada uno de e y f es 0; o

en donde:

T^1 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^1 es $-CONH-$;
 T^2 es alquilo (C_1-C_{12}) sustituido y V^2 es $-CO-$;
 T^3 es PABC y V^3 está ausente; y
 cada uno de d , e y f es 0.

En determinadas modalidades, el lado izquierdo de la estructura de enlazador anterior para el primer enlazador L^A está unido al resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrololopiridinilo, y el lado derecho de la estructura de enlace anterior para el primer enlazador L^A está unido al primer fármaco o agente activo.

Tal como se describió anteriormente, en algunas modalidades, L^B es un segundo enlazador que comprende $-(T^7-V^7)_g-(T^8-V^8)_h-(T^9-V^9)_i-(T^{10}-V^{10})_j-(T^{11}-V^{11})_k-(T^{12}-V^{12})_l-(T^{13}-V^{13})_m-$, donde cada uno de g , h , i , j , k , l y m es independientemente 0 o 1, siempre que al menos uno de g , h , i , j , k , l y m sea 1.

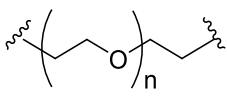
En algunas modalidades, en el segundo enlazador L^B :

T^7 se selecciona de un alquilo (C_1-C_{12}) y un alquilo (C_1-C_{12}) sustituido;
 cada uno de T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} se selecciona independientemente de alquilo (C_1-C_{12}), alquilo (C_1-C_{12}) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido,

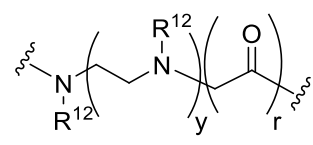
cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, $(\text{EDA})_w$, $(\text{PEG})_n$, $(\text{AA})_p$, $-(\text{CR}^{13}\text{OH})_x-$, 4-amino-piperidina (4AP), MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, PHP, un grupo acetal, un disulfuro, una hidrazina y un éster; y

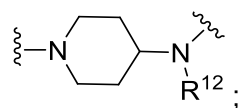
cada uno de V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} se selecciona independientemente de un enlace covalente, $-\text{CO}-$, $-\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$, $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$, $-\text{CONR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$ y $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$, en donde q es un número entero de 1 a 6;

en donde:

$(\text{PEG})_n$ es , donde n es un número entero de 1 a 30;

EDA es un resto de etilendiamina que tiene la siguiente estructura:

, donde y es un número entero de 1 a 6 y r es 0 o 1;

4-amino-piperidina (4AP) es ;

AA es un residuo de aminoácido, donde p es un número entero de 1 a 20; y

cada R^{12} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol, un arilo y un arilo sustituido, en donde cualesquiera dos grupos R^{12} adyacentes pueden enlazarse de forma cíclica para formar un anillo piperazinilo;

cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido; y

cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido.

Puede usarse cualquier grupo de enlace conveniente para T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} . Por ejemplo, puede usarse cualquiera de los grupos de enlace descritos anteriormente con respecto a T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 y T^6 para los grupos de enlace T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} .

Puede usarse cualquier grupo funcional de enlace conveniente para V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} . Por ejemplo, puede usarse cualquiera de los grupos funcionales de enlace descritos anteriormente con respecto a V^1 , V^2 , V^3 , V^4 , V^5 y V^6 para los grupos funcionales de enlace V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} .

En determinadas modalidades, cada R^{13} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido. En estas modalidades, el alquilo, el alquilo sustituido, el arilo y el arilo sustituido son tal como se describieron anteriormente para R^{13} .

En determinadas modalidades, cada R^{15} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido. En estas modalidades, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido son tal como se describió anteriormente para R^{15} . En estas modalidades, varios sustituyentes posibles son como tal se describieron anteriormente para R^{15} .

En determinadas modalidades del segundo enlazador, L^B , uno o más de los grupos de enlace T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} está opcionalmente sustituido con un glicósido o derivado de glicósido. En determinadas modalidades, el glicósido o derivado de glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En determinadas modalidades del segundo enlazador, L^B , las estructuras de unión de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, y PHP que se mostraron anteriormente pueden estar sustituidas con uno o más grupos adicionales seleccionados de un glicósido y un derivado de glicósido. Por ejemplo, en algunas modalidades de las estructuras de unión de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, y PHP que se mostraron anteriormente, el anillo fenilo puede estar sustituido con uno o más grupos adicionales seleccionados de un glicósido y un derivado de glicósido. En determinadas modalidades, el glicósido o derivado de glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En algunas modalidades, cada uno de T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, cada uno de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP y PHP está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, el glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En algunas modalidades de L^B :

cada uno de g, h, i, j y k es 1;

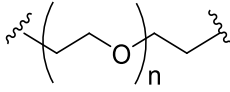
l y m son 0;

T^7 es un enlace covalente;

cada uno de T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} y T^{12} se selecciona independientemente de un enlace covalente, alquilo (C_1 - C_{12}), alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, $(AA)_p$, $-(CR^{13}OH)_x$, 4-amino-piperidina (4AP), MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP, PHP, un grupo acetal, una hidrazina y un éster; y

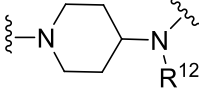
cada uno de V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} y V^{12} se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace covalente, $-\text{CO}-$, $-\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$, $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$, $-\text{CONR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$, $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$ y $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$;

en donde:

$(\text{PEG})_n$ es , donde n es un número entero de 1 a 30;

EDA es un resto de etilendiamina que tiene la siguiente estructura:

, donde y es un número entero de 1 a 6 y r es 0 o 1;

4-amino-piperidina (4AP) es ; y

cada R^{12} se selecciona independientemente de hidrógeno, un alquilo, un alquilo sustituido, un resto de polietilenglicol, un arilo y un arilo sustituido, en donde cualesquiera dos grupos R^{12} adyacentes pueden enlazarse de forma cíclica para formar un anillo piperazínico.

En algunas modalidades, cada uno de T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 , T^6 , T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} y T^{12} está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, cada uno de MABO, MABC, PABO, PABC, PAB, PABA, PAP y PHP está opcionalmente sustituido con un glicósido.

En algunas modalidades, el glicósido se selecciona entre un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc.

En determinadas modalidades, T^7 , T^8 , T^9 , T^{10} , T^{11} , T^{12} y T^{13} y V^7 , V^8 , V^9 , V^{10} , V^{11} , V^{12} y V^{13} se seleccionan de los siguientes:

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es $-\text{NHCO}-$;

T^8 es alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$) y V^8 es $-\text{CO}-$;

T^9 es $(\text{AA})_p$ y V^9 está ausente;

T^{10} es PABC y V^{10} está ausente; y

cada uno de k, l y m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es $-\text{NHCO}-$;

T^8 es alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$) y V^8 es $-\text{CONH}-$;

T^9 es $(\text{PEG})_n$ y V^9 es $-\text{CO}-$;

T^{10} es $(\text{AA})_p$ y V^{10} está ausente; y

T^{11} es PABC y V^{11} está ausente; y

cada uno de l y m es 0; o

en donde:

T⁷ está ausente y V⁷ es -NHCO-;
 T⁸ es alquilo (C₁-C₁₂) y V⁸ es -CO-;
 T⁹ es un análogo de aminoácido y V⁹ es -NH-;
 T¹⁰ es (PEG)_n y V¹⁰ es -CO-;
 T¹¹ es (AA)_p y V¹¹ está ausente;
 T¹² es PABC y V¹² está ausente; y
 m es 0; o

en donde:

T⁷ está ausente y V⁷ es -NHCO-;
 T⁸ es alquilo (C₁-C₁₂) y V⁸ es -CONH-;
 T⁹ es (PEG)_n y V⁹ es -CO-;
 T¹⁰ es (AA)_p y V¹⁰ está ausente;
 T¹¹ es PABC y V¹¹ está ausente; y
 cada uno de l y m es 0; o

en donde:

T⁷ está ausente y V⁷ es -NHCO-;
 T⁸ es alquilo (C₁-C₁₂) y V⁸ es -CONH-;
 T⁹ es alquilo (C₁-C₁₂) sustituido y V⁹ es -CO-;
 T¹⁰ es (AA)_p y V¹⁰ está ausente;
 T¹¹ es PABC y V¹¹ está ausente; y
 cada uno de l y m es 0; o

en donde:

T⁷ está ausente y V⁷ es -NHCO-;
 T⁸ es alquilo (C₁-C₁₂) y V⁸ es -CONH-;
 T⁹ es (PEG)_n y V⁹ es -CO-;
 T¹⁰ es (AA)_p y V¹⁰ está ausente;
 T¹¹ es PABA y V¹¹ es -CO-;
 T¹² es alquilo (C₁-C₁₂) y V¹² está ausente; y
 m es 0; o

en donde:

T⁷ está ausente y V⁷ es -NHCO-;
 T⁸ es alquilo (C₁-C₁₂) y V⁸ es -CO-;
 T⁹ es 4AP y V⁹ es -CO-;
 T¹⁰ es alquilo (C₁-C₁₂) y V¹⁰ es -CO-;
 T¹¹ es (AA)_p y V¹¹ está ausente;

T^{12} es PABC y V^{12} está ausente; y
m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es -NHCO-;
 T^8 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^8 es -CO-;
 T^9 es 4AP y V^9 es -CO-;
 T^{10} es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^{10} es -O-;
 T^{11} es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^{11} es -CO-;
 T^{12} es $(AA)_p$ y V^{12} está ausente; y
 T^{13} es PABC y V^{13} está ausente; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es -NHCO-;
 T^8 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^8 es -CO-;
 T^9 es un análogo de aminoácido y V^9 está ausente;
 T^{10} es $(AA)_p$ y V^{10} está ausente;
 T^{11} es PABC y V^{11} está ausente; y
cada uno de l y m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es -NHCO-;
 T^8 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^8 es -CONH-;
 T^9 es $(PEG)_n$ y V^9 es -CONH-;
 T^{10} es alquilo (C_1 - C_{12}) sustituido y V^{10} es -CO-;
 T^{11} es $(AA)_p$ y V^{11} está ausente;
 T^{12} es PABC y V^{12} está ausente; y
m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es -NHCO-;
 T^8 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^8 es -CO-;
 T^9 es $(AA)_p$ y V^9 es -NH-;
 T^{10} es $(PEG)_n$ y V^{10} es -CO-;
 T^{11} es $(AA)_p$ y V^{11} está ausente;
 T^{12} es PABC y V^{12} está ausente; y
m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es -NHCO-;
 T^8 es alquilo (C_1 - C_{12}) y V^8 es -CONH-;
 T^9 es $(PEG)_n$ y V^9 es -CO-;

T^{10} es $(AA)_p$ y V^{10} está ausente;

T^{11} es PAP y V^{11} es $-C(O)O-$; y

cada uno de l y m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^8 es $-CO-$;

T^9 es $(AA)_p$ y V^9 está ausente;

T^{10} es PABC y V^{10} está ausente;

T^{11} es PAP y V^{11} es $-C(O)O-$; y

cada uno de l y m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^8 es $-CONH-$;

T^9 es alquilo (C_1-C_{12}) sustituido y V^9 es $-CO-$;

T^{10} es PABC y V^{10} está ausente; y

cada uno de k, l y m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^8 está ausente;

T^9 es heteroarilo y V^9 está ausente;

T^{10} es alquilo (C_1-C_{12}) y V^{10} es $-CONH-$;

T^{11} es $(PEG)_n$ y V^{11} es $-CO-$; y

cada uno de l y m es 0; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^8 está ausente;

T^9 es heteroarilo y V^9 está ausente;

T^{10} es alquilo (C_1-C_{12}) y V^{10} es $-CONH-$;

T^{11} es alquilo (C_1-C_{12}) sustituido y V^{11} es $-CO-$;

T^{12} es $(AA)_p$ y V^{12} está ausente; y

T^{13} es PAB y V^{13} está ausente; o

en donde:

T^7 está ausente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1-C_{12}) y V^8 está ausente;

T^9 es heteroarilo y V^9 está ausente;

T^{10} es alquilo (C_1-C_{12}) y V^{10} es $-CONH-$;

T^{11} es alquilo (C_1-C_{12}) sustituido y V^{11} es $-CO-$;

T¹² es (AA)_p y V¹² está ausente; y

T¹³ es PABC y V¹³ está ausente.

En determinadas modalidades, el lado izquierdo de la estructura de enlazador anterior para el segundo enlazador L^B está unido al resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrololopiridinilo, y el lado derecho de la estructura de enlace anterior para el segundo enlazador L^B está unido al segundo fármaco o agente activo.

En determinadas modalidades, el conjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco donde el anticuerpo contra TF y los fármacos están unidos por enlazadores tal como se describió anteriormente. En algunos casos, el enlazador m(por ejemplo, L^A y/o L^B) es un enlazador escindible. Un enlazador escindible es un enlazador que incluye uno o más restos escindibles, donde el resto escindible incluye uno o más enlaces que pueden disociarse bajo ciertas condiciones, mediante lo cual se separa el enlazador escindible en dos o más partes separables. Por ejemplo, el resto escindible puede incluir uno o más enlaces covalentes que, bajo ciertas condiciones, pueden disociarse o romperse para separar el enlazador escindible en dos o más partes. En sí, los enlazadores que se incluyen en un conjugado de anticuerpo-fármaco pueden ser enlazadores escindibles, de modo que, en condiciones apropiadas, el enlazador escindible se escinde para separar o liberar el fármaco del anticuerpo en el sitio de acción deseado para el fármaco.

En algunos casos, un enlazador escindible incluye dos restos escindibles, tal como un primer resto escindible y un segundo resto escindible. Los restos escindibles se pueden configurar de tal manera que se necesite la escisión de ambos restos escindibles para separar o liberar el fármaco del anticuerpo contra TF en un sitio de acción diana deseado para el fármaco. Por ejemplo, la escisión de un enlazador escindible se puede lograr al escindir inicialmente uno de los dos restos escindibles y, luego, escindir el otro de los dos restos escindibles. En determinadas modalidades, un enlazador escindible incluye un primer resto escindible y un segundo resto escindible que dificulta la escisión del primer resto escindible. Por «dificulta la escisión» se entiende que la presencia de un segundo resto escindible no escindido reduce la probabilidad o inhibe sustancialmente la escisión del primer restoescindible, por lo tanto, reduce sustancialmente la cantidad o impide la escisión del enlazador escindible. Por ejemplo, la presencia del segundo resto escindible no escindido puede dificultar la escisión del primer resto escindible. La dificultad de la escisión del primer resto escindible por la presencia del segundo resto escindible, a su vez, reduce sustancialmente la cantidad o impide la liberación del fármaco del anticuerpo. Por ejemplo, la liberación prematura del fármaco del anticuerpo puede reducirse o prevenirse sustancialmente hasta que el conjugado de anticuerpo-fármaco esté en el sitio de acción diana deseado para el fármaco o cerca de este.

En algunos casos, dado que el segundo resto escindible dificulta la escisión del primer resto escindible, se puede lograr la escisión del enlazador escindible al escindir inicialmente el segundo

resto escindible y, luego, escindir el primer resto escindible. La escisión del segundo resto escindible puede reducir o eliminar la dificultad en la escisión del primer resto escindible, lo cual permite que el primer resto escindible se escinda. La escisión del primer resto escindible puede provocar que el enlazador se disocie o se separe en dos o más partes, tal como se describió anteriormente para liberar el fármaco del conjugado de anticuerpo-fármaco. En algunos casos, la escisión del primer resto escindible no ocurre sustancialmente en presencia de un segundo resto escindible no escindido. Sustancialmente significa que alrededor de 10 % o menos de escisión del primer resto escindible ocurre en presencia de un segundo resto escindible no escindido, tal como alrededor de 9 % o menos, o alrededor de 8 % o menos, o alrededor de 7 % o menos, o alrededor de 6 % o menos, o alrededor de 5 % o menos, o alrededor de 4 % o menos, o alrededor de 3 % o menos, o alrededor de 2 % o menos, o alrededor de 1 % o menos, o alrededor de 0,5 % o menos, o alrededor de 0,1 % o menos de escisión del primer resto escindible ocurre en presencia de un segundo resto escindible no escindido.

Dicho de otra manera, el segundo resto escindible puede proteger el primer resto escindible de la escisión. Por ejemplo, la presencia de un segundo resto escindible no escindido puede proteger el primer resto escindible de la escisión y, por lo tanto, reducir o prevenir sustancialmente la liberación prematura del fármaco del anticuerpo hasta que el conjugado de anticuerpo-fármaco esté en el sitio de acción diana deseado para el fármaco o cerca de este. Como tal, la escisión del segundo resto escindible expone el primer resto escindible (por ejemplo, desprotege el primer resto escindible), lo que permite que el primer resto escindible se escinda, lo que da como resultado la escisión del enlazador escindible que, a su vez, separa o libera el fármaco del anticuerpo en un sitio de acción diana deseado para el fármaco, tal como se describió anteriormente. En determinados casos, la escisión del segundo resto escindible expone el primer resto escindible a la escisión posterior, pero la escisión del segundo resto escindible no da como resultado en sí misma la escisión del enlazador escindible (es decir, la escisión del primer resto escindible todavía es necesaria para escindir el enlazador escindible).

Cada uno de los restos escindibles incluidos en el enlazador escindible puede ser un resto enzimáticamente escindible. Por ejemplo, el primer resto escindible puede ser un primer resto enzimáticamente escindible y el segundo resto escindible puede ser un segundo resto enzimáticamente escindible. Un resto enzimáticamente escindible es un resto escindible que se puede separar en dos o más partes, tal como se describió anteriormente, a través de la acción enzimática de una enzima. El resto enzimáticamente escindible puede ser cualquier resto escindible que se puede escindir a través de la acción enzimática de una enzima, tal como, de modo no taxativo, un éster, un péptido, un glicósido y similares. En algunos casos, la enzima que escinde el resto enzimáticamente escindible está presente en un sitio de acción diana deseado, tal como el sitio de acción diana deseado del fármaco que se va a liberar del conjugado de anticuerpo-fármaco. En algunos casos, la enzima que escinde el resto enzimáticamente

escindible no está presente en una cantidad significativa en otras áreas, tal como en sangre completa, plasma o suero. Como tal, la escisión de un resto enzimáticamente escindible puede controlarse de tal manera que se produzca una escisión sustancial en el sitio de acción deseado, mientras que la escisión no ocurra significativamente en otras áreas o antes de que el conjugado de anticuerpo-fármaco alcance el sitio de acción deseado.

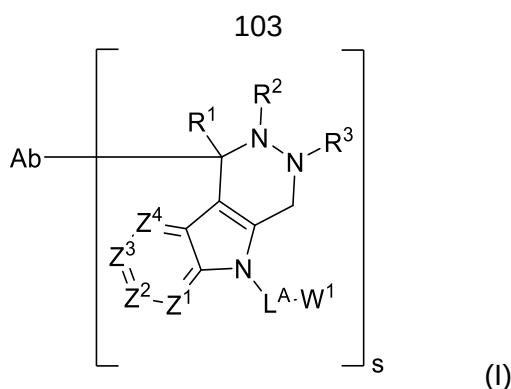
Por ejemplo, tal como se describe en la presente, los conjugados de anticuerpo-fármaco de la presente descripción pueden utilizarse para el tratamiento del cáncer, tal como para la administración de un fármaco terapéutico contra el cáncer a un sitio de acción deseado donde las células cancerosas estén presentes. En algunos casos, las enzimas, tal como una enterasa que escinde los enlaces de éster o una glicosidasa que escinde los enlaces glicosídicos, pueden ser un biomarcador del cáncer que se sobreexpresa en las células cancerosas. La sobreexpresión, y por lo tanto la localización, de determinadas enzimas en el cáncer se puede utilizar en el contexto de los restos enzimáticamente escindibles incluidos en los enlazadores escindibles de los conjugados de anticuerpo-fármaco de la presente descripción para liberar específicamente el fármaco en el sitio de acción deseado (es decir, el sitio del cáncer (y la enzima sobreexpresada)). Por lo tanto, en algunas modalidades, el resto escindible enzimáticamente es un resto escindible (por ejemplo, un éster o un glicósido) que puede ser escindido por una enzima que se sobreexpresa en células cancerosas. Por ejemplo, la enzima puede ser una esterasa. Como tal, en algunos casos, el resto escindible enzimáticamente es un resto escindible (por ejemplo, un éster) que puede ser escindido por una enzima esterasa. En algunos casos, la enzima puede ser una glicosidasa. Como tal, en algunos casos, el resto escindible enzimáticamente es un resto escindible (por ejemplo, un glicósido o un derivado de glicósido) que puede ser escindido por una enzima glicosidasa.

En determinadas modalidades, el resto enzimáticamente escindible es un enlace de éster. Por ejemplo, el primer resto escindible descrito anteriormente (es decir, el resto escindible protegido de la escisión prematura por el segundo resto escindible) puede incluir un éster. La presencia de un segundo resto no escindible puede proteger el primer resto escindible (éster) de la escisión por una enzima esterasa, y reducir o prevenir de ese modo sustancialmente la liberación prematura del fármaco del anticuerpo hasta que el conjugado de anticuerpo-fármaco esté en el sitio de acción diana deseado para el fármaco o cerca de este. En algunos casos, una parte del enlazador asyacente al primer resto escindible está enlazado o incluye un sustituyente, donde el sustituyente comprende el segundo resto escindible. En algunos casos, el segundo resto escindible incluye un glicósido o derivado de glicósido.

En algunas modalidades, el resto enzimáticamente escindible es un resto de azúcar, tal como un glicósido (o glicosilo) o derivado de glicósido. En algunos casos, el glicósido o derivado de glicósido puede facilitar un aumento en la hidrofiliidad del enlazador escindible en comparación con un enlazador escindible que no incluye el glicósido o derivado de glicósido. El glicósido o

derivado de glicósido puede ser cualquier glicósido o derivado de glicósido adecuado para su uso en el enlazador escindible y que se puede escindir a través de la acción enzimática de una enzima. Por ejemplo, el segundo resto escindible (es decir, el resto escindible que protege el primer resto escindible de la escisión prematura) puede ser un glicósido o derivado de glicósido. Por ejemplo, en algunas modalidades, el primer resto escindible incluye un éster y el segundo resto escindible incluye un glicósido o un derivado de glicósido. En determinadas modalidades, el segundo resto escindible es un glicósido o derivado de glicósido seleccionado de un glucurónido, un galactósido, un glucósido, un manósido, un fucósido, O-GlcNAc y O-GalNAc. En algunos casos, el segundo resto escindible es un glucurónido. En algunos casos, el segundo resto escindible es un galactósido. En algunos casos, el segundo resto escindible es un glucósido. En algunos casos, el segundo resto escindible es un manósido. En algunos casos, el segundo resto escindible es un fucósido. En algunos casos, el segundo resto escindible es O-GlcNAc. En algunos casos, el segundo resto escindible es O-GalNAc.

El glicósido o derivado de glicósido se puede acoplar (unir covalentemente) al enlazador escindible a través de un enlace glicosídico. El enlace glicosídico puede unir el glicósido o derivado de glicósido al enlazador escindible a través de varios tipos de enlaces, tales como, de modo no taxativo, un enlace O-glicosídico (un O-glicósido), un enlace N-glicosídico (una glicosilamina), un enlace S-glicosídico (un tioglicósido) o un enlace C-glicosídico (un C-glicósido o C-glicosilo). En algunos casos, el enlace glicosídico es un enlace O-glicosídico (un O-glicósido). En algunos casos, el glicósido o derivado de glicósido se puede separar del enlazador escindible al que está unido por una enzima (por ejemplo, a través de la hidrólisis mediada enzimáticamente del enlace glicosídico). Un glicósido o derivado de glicósido puede removerse o escindirse del enlazador escindible por cualquier enzima conveniente que sea capaz de llevar a cabo la escisión (hidrólisis) del enlace glicosídico que une el glicósido al enlazador escindible. Un ejemplo de una enzima que se puede utilizar para mediar la escisión (hidrólisis) del enlace glicosídico que une el glicósido o derivado de glicósido al enlazador escindible es una glicosidasa, tal como una glucuronidasa, una galactosidasa, una glucosidasa, una manosidasa, una fucosidasa y similares. También se pueden utilizar otras enzimas adecuadas para mediar la escisión (hidrólisis) del enlace glicosídico que une el glicósido o derivado de glicósido al enlazador escindible. En algunos casos, la enzima utilizada para mediar la escisión (hidrólisis) del enlace glicosídico que une el glicósido o derivado de glicósido al enlazador escindible se encuentra en el sitio de acción deseado para el fármaco del conjugado de anticuerpo-fármaco o cerca de este. Por ejemplo, la enzima puede ser una enzima lisosomal, tal como una glicosidasa lisosomal, que se encuentra en las células en el sitio de acción deseado para el fármaco del conjugado de anticuerpo-fármaco o cerca de este. En algunos casos, la enzima es una enzima que se encuentra en el sitio diana o cerca de este, donde se encuentra la enzima que media la escisión del primer resto escindible. En algunas modalidades, un TF-ADC está representado por la Fórmula (I):



en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF;

cada uno de Z¹, Z² y Z⁴ es independientemente CR⁴;

Z³ es C-L^B-W²;

cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ se selecciona de hidrógeno y alquilo (C₁-C₁₂);

L^A es un primer enlazador, en donde:

T¹ es alquilo (C₁-C₁₂) y V¹ es -CONH-;

T² es alquilo (C₁-C₁₂) sustituido y V² es -CO-;

T³ es (AA)_p, donde p es un número entero de 1-20 y V³ es un enlace covalente;

T⁴ es PABC y V⁴ es un enlace covalente;

cada uno de a, b, c y d es 1;

cada uno de e y f es 0; y

L^B es un segundo enlazador, en donde

T⁷ es un enlace covalente y V⁷ es -NHCO-;

T⁸ es alquilo (C₁-C₁₂) y V⁸ es -CONH-;

T⁹ es alquilo (C₁-C₁₂) sustituido y V⁹ es -CO-;

T¹⁰ es (AA)_p, donde p es un número entero de 1-20 y V¹⁰ es un enlace covalente;

T¹¹ es PABC y V¹¹ es un enlace covalente; y

cada uno de h, i, j y k es 1; y

cada uno de l y m es 0;

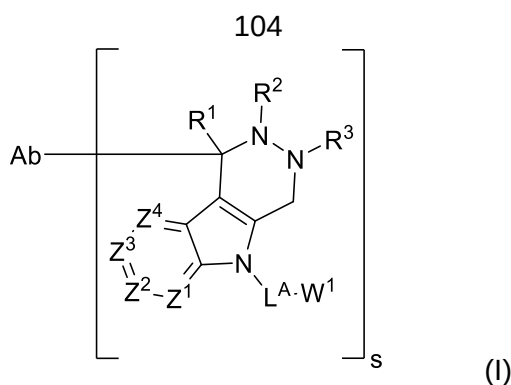
s es un número entero de 1 a 10;

W¹ es un primer fármaco; y

W² es un segundo fármaco.

En algunas modalidades, uno o ambos de W¹ y W² son análogos de camptotecina, por ejemplo, belotecán.

En algunas modalidades, un TF-ADC está representado por la Fórmula (I):



en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF;

cada uno de Z^1 , Z^2 y Z^4 es independientemente CR^4 ;

Z^3 es $C-L^B-W^2$;

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se selecciona de hidrógeno y alquilo (C_1 - C_{12});

L^A es un enlazador, en donde:

T^1 es alquilo (C_1 - C_6) y V^1 es $-CONH-$;

T^2 es alquileo (C_1 - C_6) sustituido con $-NHCO(PEG)_k$, en donde k es un número entero de 2 a 10 y V^2 es $-CO-$;

T^3 es $(AA)_2$ y V^3 es un enlace covalente;

T^4 es PABC sustituido con un glicósido y V^4 es un enlace covalente;

cada uno de a, b, c y d es 1; y

cada uno de e y f es 0; y

L^B es un enlazador, en donde

T^7 es un enlace covalente y V^7 es $-NHCO-$;

T^8 es alquilo (C_1 - C_6) y V^8 es $-CONH-$;

T^9 es alquileo (C_1 - C_6) sustituido con $-NHCO(PEG)_k$, en donde k es un número entero de 2 a 10 y V^9 es $-CO-$;

T^{10} es $(AA)_2$ y V^{10} es un enlace covalente;

T^{11} es PABC sustituido con un glicósido y V^{11} es un enlace covalente;

cada uno de h, i, j y k es 1; y

cada uno de l y m es 0;

s es un número entero de 1 a 10;

W^1 es un primer fármaco; y

W^2 es un segundo fármaco.

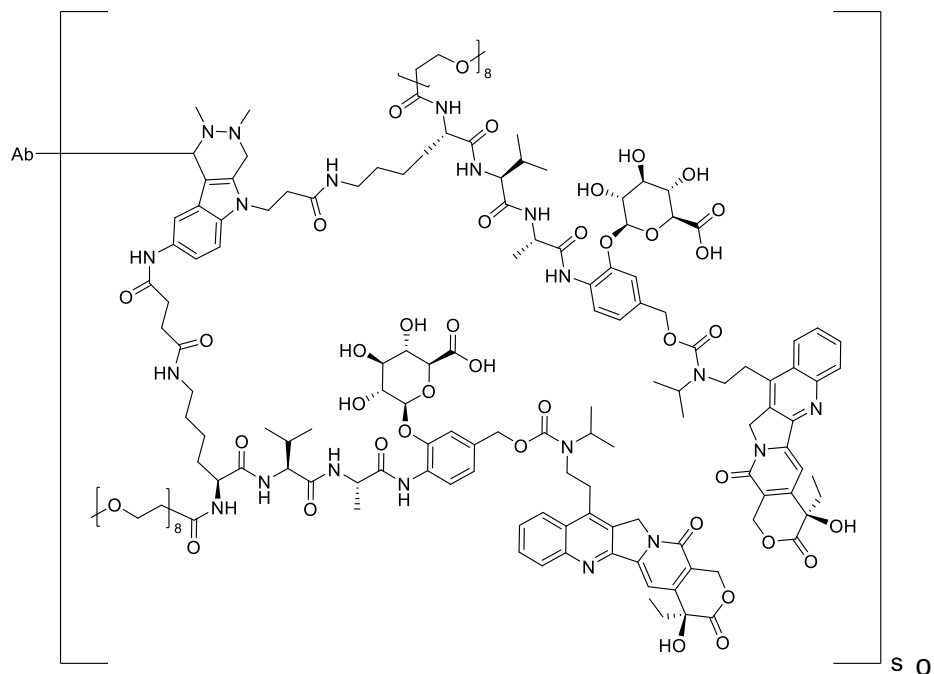
En algunas modalidades, el PABC de uno o ambos de T^4 y T^{11} está sustituido con un glucurónido.

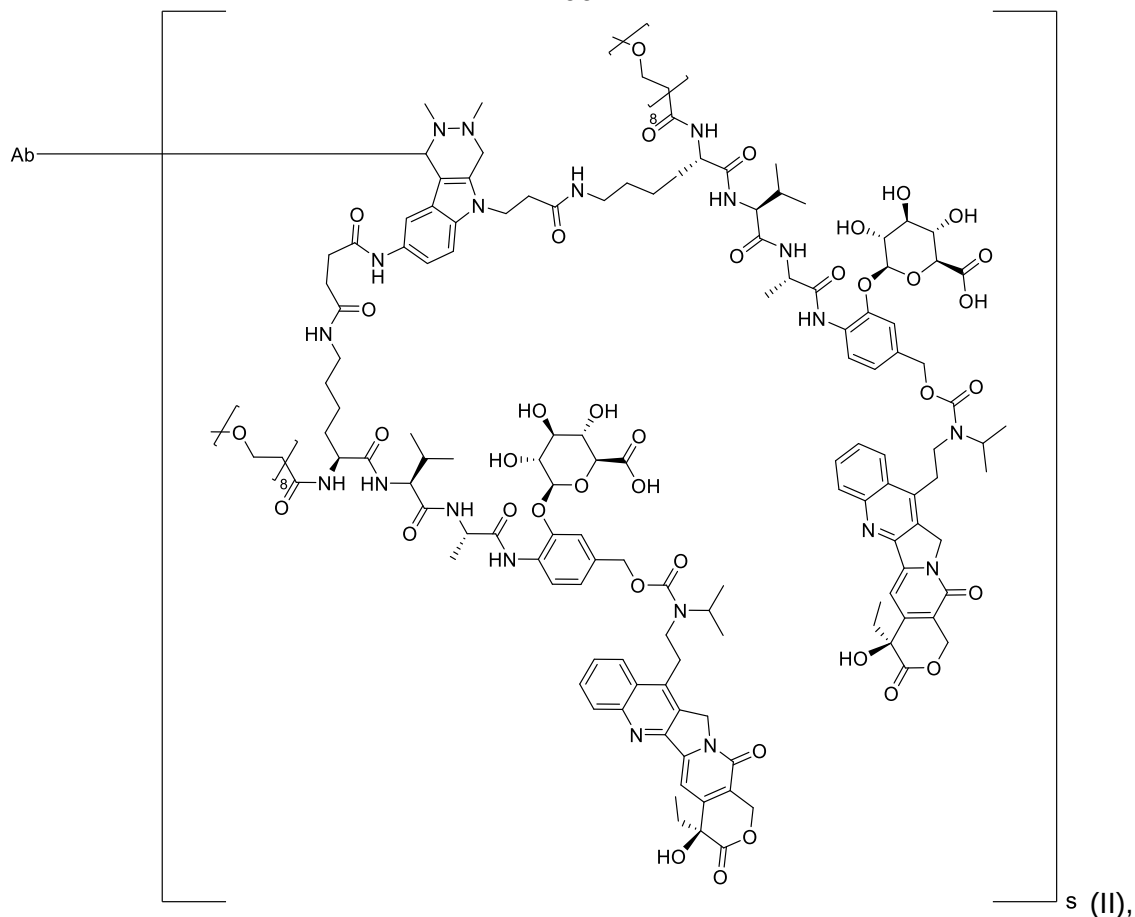
En algunas modalidades, uno o ambos de T^1 y T^8 es etilo. En algunas modalidades, uno o ambos de T^2 y T^9 es alquileo C_5 sustituido con $-NHCO(PEG)_k$, donde k es un número entero de 5 a 10.

En algunas modalidades, uno o ambos de W^1 y W^2 son análogos de camptotecina, por ejemplo, belotecán.

En algunas modalidades, un TF-ADC, tal como se describe en la presente, comprende cualquier carga activa, cualquier enlazador o cualquier enlazador-carga activa, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 2022-0241423 y la publicación internacional n.º WO 2022187370, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

En algunas modalidades, el TF-ADC está representado por la Fórmula (II):





en donde:

Ab representa el anticuerpo que se une a TF; y

s es un número entero de 1 a 10.

En algunas modalidades, s es un número entero de 1 a 4.

Cualquiera de las entidades químicas, enlazadores y restos de conjugación establecidos en las estructuras anteriores pueden adaptarse para su uso en los compuestos y conjugados de la presente.

En las patentes estadounidenses n.º 9.310.374 y n.º 9.493.413, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante referencia, se encuentran descripciones adicionales relacionadas con compuestos de hidrazinilo-indolilo e hidrazinilo-pirrolo-piridinilo y métodos para producir un conjugado.

ANTICUERPOS CONTRA EL FACTOR TISULAR (TF)

Tal como se señaló anteriormente, un conjugado de sujeto comprende un anticuerpo (Ab) que se une a TF. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede modificarse para incluir un residuo de 2-formilglicina (fGly). Tal como se usan en la presente, los aminoácidos pueden mencionarse por su nombre estándar, su abreviatura de tres letras estándar y/o su abreviatura de una letra estándar, tal como: Alanina o Ala o A; Cisteína o Cis o C; Ácido aspártico o Asp o D; Ácido glutámico o Glu o E; Fenilalanina o Phe o F; Glicina o Gly o G; Histidina o His o H; Isoleucina o Ile o I; Lisina o Lys o K; Leucina o Leu o L; Metionina o Met o M; Asparagina o Asn

o N; Prolina o Pro o P; Glutamina o Gln o Q; Arginina o Arg o R; Serina o Ser o S; Treonina o Thr o T; Valina o Val o V; Triptófano o Trp o W; y Tirosina o Tyr o Y.

Los TF-ADC descritos en la presente comprenden un fármaco y un anticuerpo contra TF conjugado con él. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a TF, tal como una proteína TF, un polipéptido TF, un fragmento de polipéptido TF, un péptido TF o un epítipo de TF. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF es un anticuerpo humano o humanizado (por ejemplo, que comprende regiones constantes humanas) que se une a TF. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF puede unirse a TF que se expresa en la superficie de una célula de mamífero (por ejemplo, humana), incluida una célula tumoral que expresa TF. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF se une a un epítipo extracelular de TF expresado en una célula tal como una célula tumoral (por ejemplo, un epítipo de TF extracelular). En algunas modalidades, el TF es un TF humano. En la presente se describe una secuencia de aminoácidos ilustrativa de TF humano (SEQ ID NO:175).

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF compite por la unión a TF con un anticuerpo contra TF de referencia que comprende una región VH, región VL, CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, tal como una secuencia de aminoácidos de una región VH, región VL, CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL, tal como se describe en cualquiera de las **Tablas 1-2**. Por consiguiente, en algunas modalidades, el anticuerpo contra TF compite por la unión a TF con un anticuerpo contra TF de referencia que comprende una, dos y/o tres CDR de VH y/o una, dos y/o tres CDR de VL de: (a) el anticuerpo designado como EXMA-006; o (b) el anticuerpo designado como EXMA-007. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un fármaco conjugado (directa o indirectamente) con un anticuerpo contra TF que compite por la unión a TF con un anticuerpo contra TF de referencia que comprende una, dos y/o tres CDR de VH y una, dos y/o tres CDR de VL de: (a) el anticuerpo designado como EXMA-006; o (b) el anticuerpo designado como EXMA-007. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF compite por la unión a TF con un anticuerpo contra TF de referencia que comprende una región VH y una región VL de: (a) el anticuerpo designado como EXMA-006; o (b) el anticuerpo designado como EXMA-007. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF compite por la unión a TF con un anticuerpo contra TF de referencia que comprende: (a) una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26; o (b) una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42. En algunas modalidades, se pueden utilizar otros anticuerpos contra TF adecuados, véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO2019136309 y WO2021003399, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una región VH, región VL, CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, tal como una secuencia de aminoácidos de una región VH, región VL, CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL, tal como se describe en cualquiera de las **Tablas 1-2**. Por consiguiente, en algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una, dos y/o tres CDR de cadena pesada y/o una, dos y/o tres CDR de cadena ligera de: (a) el anticuerpo designado como EXMA-006; o (b) el anticuerpo designado como EXMA-007. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una, dos y/o tres CDR de cadena pesada y/o una, dos y/o tres CDR de cadena ligera de: (a) el anticuerpo designado como EXMA-006; o (b) el anticuerpo designado como EXMA-007.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una región VH, que comprende una o más (como uno, dos o tres) CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH, tal como se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**; y/o una región VL, que comprende una o más (como uno, dos o tres) CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL, tal como se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF es biespecífico y comprende una primera región de unión que comprende una, dos y/o tres CDR de cadena pesada y/o una, dos y/o tres CDR de cadena ligera, tal como se describe en cualquiera de las **Tablas 1-2** y una segunda región que comprende una, dos y/o tres CDR de cadena pesada y/o una, dos y/o tres CDR de cadena ligera de un agente de unión que se une a un segundo antígeno diana que no es TF. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF es biespecífico y comprende un primer dominio de unión que comprende una, dos y/o tres CDR de cadena pesada y/o una, dos y/o tres CDR de cadena ligera, tal como se describe en cualquiera de las **Tablas 1-2** y un segundo dominio de unión que comprende una, dos y/o tres CDR de cadena pesada y/o una, dos y/o tres CDR de cadena ligera de un agente de unión que se une a un segundo epítipo de TF.

El anticuerpo designado como EXMA-006 comprende una secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO:25 y una secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO:26.

El anticuerpo designado como EXMA-007 comprende una secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO:41 y una secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO:42.

Tabla 1: Secuencias de anticuerpo EXMA-006-CDR Sequences

		Ilustrativa*	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Sec. de CDR de VH	CDR1 de VH	GYTFDVYGIS (SEQ ID NO:1)	VYGIS (SEQ ID NO:7)	GYTFDVY (SEQ ID NO:8)	GYTFDVYGIS (SEQ ID NO:1)	DVYGIS (SEQ ID NO:15)	GYTFDVYG (SEQ ID NO:21)
	CDR2 de VH	WIAPYSGNTNYAQ KLQG (SEQ ID NO:2)	WIAPYSGNTNY AQKLQG (SEQ ID NO:2)	PYSG (SEQ ID NO:9)	WIAPYSGNTN (SEQ ID NO:14)	WMGWIAPYSGN TN (SEQ ID NO:16)	IAPYSGNT (SEQ ID NO:22)
	CDR3 de VH	DAGTYSPFGYGM DV (SEQ ID NO:3)	DAGTYSPFGYG MDV (SEQ ID NO:3)	AGTYSPFGYGM D (SEQ ID NO:10)	DAGTYSPFGYG MDV (SEQ ID NO:3)	ARDAGTYSPFGY GMD (SEQ ID NO:17)	ARDAGTYSPFGY GMDV (SEQ ID NO:23)
Sec. de CDR de VL	CDR1 de VL	QASQSINNWL (SEQ ID NO:4)	QASQSINNWL (SEQ ID NO:4)	SQSINNW (SEQ ID NO:11)	QASQSINNWL (SEQ ID NO:4)	NNWLAWY (SEQ ID NO:18)	QSINNW (SEQ ID NO:24)
	CDR2 de VL	KAYNLES (SEQ ID NO:5)	KAYNLES (SEQ ID NO:5)	KAY (SEQ ID NO:12)	KAYNLES (SEQ ID NO:5)	LLIYKAYNLE (SEQ ID NO:19)	KAY (SEQ ID NO:12)
	CDR3 de VL	QLFQSLPPFT (SEQ ID NO:6)	QLFQSLPPFT (SEQ ID NO:6)	FQSLPPF (SEQ ID NO:13)	QLFQSLPPFT (SEQ ID NO:6)	QLFQSLPPF (SEQ ID NO:20)	QLFQSLPPFT (SEQ ID NO:6)
Secuencia de VH*: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFDVYGIS WVRQAPGQGLEWMG WIAPYSGNTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDT AVYYCARD DAGTYSPFGYGM DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:25)							
Secuencia de VL*: DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC QASQSINNWLAWY QKPKGAPKLLIY KAYNLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC QLFQSLPPFT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:26)							

*Las secuencias de CDR ilustrativas abarcan aminoácidos según lo determinado por Kabat más Chothia

Tabla 2: Secuencias del anticuerpo EXMA-007-CDR

		Ilustrativa*	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Sec. de CDR de VH	CDR1 de VH	GYTFDAYGIS (SEQ ID NO:27)	AYGIS (SEQ ID NO:31)	GYTFDAY (SEQ ID NO:32)	GYTFDAYGIS (SEQ ID NO:27)	DAYGIS (SEQ ID NO:35)	GYTFDAYG (SEQ ID NO:39)
	CDR2 de VH	WIAPYSGNTNYA QKLQG (SEQ ID NO:2)	WIAPYSGNTNYA QKLQG (SEQ ID NO:2)	PYSG (SEQ ID NO:9)	WIAPYSGNTN (SEQ ID NO:14)	WMGWIAPYSGN TN (SEQ ID NO:16)	IAPYSGNT (SEQ ID NO:22)
	CDR3 de VH	DAGTYSPFGYG MDV (SEQ ID NO:3)	DAGTYSPFGYGM DV (SEQ ID NO:3)	AGTYSPFGYGM D (SEQ ID NO:10)	DAGTYSPFGYGM DV (SEQ ID NO:3)	ARDAGTYSPFGY GMD (SEQ ID NO:17)	ARDAGTYSPFGY GMDV (SEQ ID NO:23)
Sec. de CDR de VL	CDR1 de VL	RASESISNWLA (SEQ ID NO:28)	RASESISNWLA (SEQ ID NO:28)	SESIONW (SEQ ID NO:33)	RASESISNWLA (SEQ ID NO:28)	SNWLAWY (SEQ ID NO:36)	ESIONW (SEQ ID NO:40)
	CDR2 de VL	KAYSLEY (SEQ ID NO:29)	KAYSLEY (SEQ ID NO:29)	KAY (SEQ ID NO:12)	KAYSLEY (SEQ ID NO:29)	LLIYKAYSLE (SEQ ID NO:37)	KAY (SEQ ID NO:12)
	CDR3 de VL	QQFQKLPPFT (SEQ ID NO:30)	QQFQKLPPFT (SEQ ID NO:30)	FQKLPPF (SEQ ID NO:34)	QQFQKLPPFT (SEQ ID NO:30)	QQFQKLPPF (SEQ ID NO:38)	QQFQKLPPFT (SEQ ID NO:30)
Secuencia de VH*: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKAS GYTFDAYGIS WVRQAPGQGLEWMG WIAPYSGNTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARD DAGTYSPFGYGMDV WGQGTTVTSS (SEQ ID NO:41)							
Secuencia de VL*: DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASESISNWLA WYQQKPGKAPKLLIY KAYSLEY GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC QQFQKLPPFT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42)							

*Las secuencias de CDR ilustrativas abarcan aminoácidos según lo determinado por Kabat más Chothia

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una región VH. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una región VL. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF tiene una combinación de (i) una región VH; y (ii) una región VL.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una cadena pesada que tiene una combinación de (i) una VH como, tal se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**, y (ii) una o más regiones constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH1, bisagra, CH2 y CH3). Una cadena pesada de IgG ilustrativa puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos de VH, tal como se describe en la presente y la siguiente secuencia de aminoácidos de CH1, Bisagra, CH2 y CH3:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:89).

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una cadena pesada que tiene una combinación de (i) una VH como, tal se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**, y (ii) una o más regiones constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH1, bisagra, CH2 y CH3). Una cadena pesada de IgG ilustrativa puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos de VH, tal como se describe en la presente y la siguiente secuencia de aminoácidos de CH1, Bisagra, CH2 y CH3:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:90).

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una cadena ligera que tiene una combinación de (i) una región VL, tal como se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**; y (ii) una región constante de cadena ligera (CL). Una cadena ligera ilustrativa (por ejemplo, para emparejarse con una cadena pesada de IgG) puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos de VL descrita en la presente y la siguiente secuencia de aminoácidos de CL:

RTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:95).

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una cadena ligera que tiene una combinación de (i) una región VL, tal como se describe en la presente, tal como en cualquiera de

las **Tablas 1-2**; y (ii) una región constante de cadena ligera (CL). Una cadena ligera ilustrativa (por ejemplo, para emparejarse con una cadena pesada de IgG) puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos de VL descrita en la presente y la siguiente secuencia de aminoácidos de CL:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:96)

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende (a) una cadena pesada que tiene una combinación de (i) una VH, tal como se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**, y (ii) una o más regiones constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH1, bisagra, CH2 y CH3); y (b) una cadena ligera que tiene una combinación de (i) una VL, tal como se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**, y (ii) una región constante de cadena ligera en un formato de IgG (CL1).

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS
S (SEQ ID NO:25); y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSINNWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAYNLESGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQLFQSLPPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:26).

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS
S (SEQ ID NO:41); y una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de:
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAYSLEYGVPSRFSG
SGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQFQKLPPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42)

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:93); y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSINNWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAYNLESGVPSRFS
 GSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQLFQSLPPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH
 KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:91).

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
 QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMVDWVGQGTITVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:94); y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASESISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAYSLEYGVPSRFSG
 SSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQFQKLPPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:92).

En algunas modalidades, una o ambas cadenas pesadas del anticuerpo contra TF comprenden además un péptido señal, por ejemplo, en el extremo N de la cadena. De manera adicional o alternativa, una o ambas cadenas ligeras del anticuerpo contra TF comprenden, además, un péptido señal, por ejemplo, en el extremo N de la cadena. En algunas modalidades, el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos de MMSFVSLLLVGILFHATQA (SEQ ID NO:97). En algunas modalidades, el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos de MGWSLILLFLVAVATRVHS (SEQ ID NO:98).

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una cadena pesada con un péptido señal y, por lo tanto, tiene una secuencia de aminoácidos de:

MMSFVSLLLVGILFHATQAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQ
 GLEWMGWIAPYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSF
 FGYGMVDWVGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:179), en donde los aminoácidos subrayados representan la secuencia del péptido señal.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una cadena pesada con un péptido señal y, por lo tanto, tiene una secuencia de aminoácidos de:

MMSEFVSLLLVGILFHATQAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFDAYGISWVRQAPGQ**
GLEWMGWIAPYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYS
PFGYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:180), en donde los
 aminoácidos subrayados representan la secuencia del péptido señal.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR), por ejemplo, una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL, tal como se describe en la **Tabla 1**. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR), por ejemplo, una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL, tal como se describe en la **Tabla 2**.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VH), por ejemplo, una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, tal como se describe en la **Tabla 1**. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VL), por ejemplo, una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL, tal como se describe en la **Tabla 1**. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VH), por ejemplo, una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, tal como se describe en la **Tabla 1** y una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VL), por ejemplo, una CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL, tal como se describe en la **Tabla 1**.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VH), por ejemplo, una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, tal como se describe en la **Tabla 2**. En otras modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VL), por ejemplo, una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL, tal como se describe en la **Tabla 2**. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VH), por ejemplo, una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, tal como se describe en la **Tabla 2** y una o más CDR (por ejemplo, una, dos o tres CDR de VL), por ejemplo, una CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL, tal como se describe en la **Tabla 2**.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de VH, tal como se describe en la presente, tal como en las **Tablas 1-2**. En otras

modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de VL, tal como se describe en la presente, tal como en las **Tablas 1-2**. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una o más (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de VH como, tal se describe en la presente, tal como en las **Tablas 1-2** y una o más (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de VL, tal como se describe en la presente, tal como en las **Tablas 1-2**. Por consiguiente, en algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende un CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:1, 7, 8, 15, 21, 27, 31, 32, 35 y 39. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una CDR2 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:2, 9, 14, 16 y 22. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende un CDR3 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:3, 10, 17 y 23. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VH y/o una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH seleccionadas independientemente de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, tal como se describe en cualquiera de las **Tablas 1-2**. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:4, 11, 18, 24, 28, 33, 36 y 40. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende un CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:5, 12, 19, 29 y 37. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende un CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:6, 13, 20, 30, 34 y 38. En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VL y/o una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL seleccionadas independientemente de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, CDR3 de VL, tal como se describe en la presente, tal como en cualquiera de las **Tablas 1-2**.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende las tres CDR de cadena pesada y/o las tres CDR de cadena ligera de: (a) el anticuerpo designado como EXMA-006 que comprende una secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO:25 y una secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO:26; o (b) el anticuerpo designado como EXMA-007 que comprende una secuencia de aminoácidos de VH de la SEQ ID NO:41 y una secuencia de aminoácidos de VL de la SEQ ID NO:42. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo contra TF comprende las tres CDR de cadena pesada y/o las tres CDR de cadena ligera del anticuerpo designado como EXMA-006. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo contra TF comprende las tres CDR de cadena pesada y/o las tres CDR de cadena ligera del anticuerpo designado como EXMA-006.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende: (a) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH, tal como se describe en la presente, tal como en las

Tablas 1-2; y/o (b) una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL, tal como se describe en la presente, tal como en las **Tablas 1-2**. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF en donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH, tal como se describe en la presente, tal como en las **Tablas 1-2**. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF en donde el anticuerpo comprende: una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL, tal como se describe en la presente, tal como en las **Tablas 1-2**.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5 y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12, y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:17, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos

[illegible]

ID NO:37, y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22, una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:23, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40, una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12, y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una región VH y/o una región VL descritas en la presente, en donde una VH y/o una VL comprenden secuencias marco humanas. En algunas modalidades, una región VH y/o una región VL comprenden una secuencia marco 1 (FR1), una secuencia marco 2 (FR2), una secuencia marco 3 (FR3) y/o una secuencia marco 4 (FR4), tal como una FR1 humana, una FR2 humana, una FR3 humana y/o una FR4 humana.

En algunas modalidades, se pueden determinar las CDR de un anticuerpo contra TF mediante el sistema Kabat (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Department of Health and Human Services de EE. UU., publicación NIH n.º 91-3242).

En algunas modalidades, las CDR de un anticuerpo contra TF se pueden determinar mediante el sistema Chothia, al que se hará referencia en la presente como las «CDR de Chothia» (véase, por ejemplo, Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol., 196:901-917; Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948; Chothia et al., 1992, J. Mol. Biol., 227:799-817; Tramontano A. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(1):175-82; y la patente estadounidense n.º 7.709.226).

En algunas modalidades, las CDR de un anticuerpo contra TF se pueden determinar mediante el sistema ImMunoGeneTics (IMGT®), por ejemplo, tal como se describe en Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7:132-136 y Lefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212 («CDR de IMGT® »).

En algunas modalidades, las CDR de un anticuerpo contra TF se pueden determinar mediante el sistema AbM, al que se hará referencia en la presente como las «CDR de AbM», por ejemplo, tal como se describe en MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. Véase también, por ejemplo, Martin, A., «Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains», en Antibody Engineering, Kontermann y Dübel, eds., Capítulo 31, págs. 422-439, Springer-Verlag, Berlín (2001).

En algunas modalidades, las CDR de un anticuerpo contra TF se pueden determinar mediante el sistema de Contact, a los que se hará referencia en la presente como las «CDR de Contact» (véase, por ejemplo, MacCallum RM et al., 1996, J Mol Biol 5:732-745). Las CDR de Contact se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una región variable de cadena

pesada (VH) que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:1, (ii) SEQ ID NO:7, (iii) SEQ ID NO:8, (iv) SEQ ID NO:15 y (v) SEQ ID NO:21; (2) una CDR2 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:2, (ii) SEQ ID NO:9, (iii) SEQ ID NO:14, (iv) SEQ ID NO:16 y (v) SEQ ID NO:22; y (3) una CDR3 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:3, (ii) SEQ ID NO:10, (iii) SEQ ID NO:17 y (iv) SEQ ID NO:23; y/o una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:4, (ii) SEQ ID NO:11, (iii) SEQ ID NO:18 y (iv) SEQ ID NO:24; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:5, (ii) SEQ ID NO:12 y (iii) SEQ ID NO:19; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:6, (ii) SEQ ID NO:13 y (iii) SEQ ID NO:20.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una región VH que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:1, (ii) SEQ ID NO:7, (iii) SEQ ID NO:8, (iv) SEQ ID NO:15 y (v) SEQ ID NO:21; (2) una CDR2 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:2, (ii) SEQ ID NO:9, (iii) SEQ ID NO:14, (iv) SEQ ID NO:16 y (v) SEQ ID NO:22; y (3) una CDR3 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes: (i) SEQ ID NO:3, (ii) SEQ ID NO:10, (iii) SEQ ID NO:17 y (iv) SEQ ID NO:23.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:4, (ii) SEQ ID NO:11, (iii) SEQ ID NO:18, y (iv) SEQ ID NO:24; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:5, (ii) SEQ ID NO:12, y (iii) SEQ ID NO:19; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:6, (ii) SEQ ID NO:13, y (iii) SEQ ID NO:20.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las: SEQ ID NO:4, 11, 18 y 24; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las: SEQ ID NO:5, 12 y 19; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las: SEQ ID NO:6, 13 y 20.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende: (a) una región VH que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1; y (b) una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:4, 11, 18 y 24; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:5, 12 y 19; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:6, 13 y 20.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende: (a) una región VH que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1; y (b) una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

En algunas modalidades, un TF-ADC se prepara a partir de un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25, y/o una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26.

En algunas modalidades, un TF-ADC se prepara a partir de un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se inserta con uno o más sitios fGly y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:78 u 81 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26. En algunas modalidades, un TF-ADC se prepara a partir de un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se inserta con uno o más sitios fGly y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:78 u 81 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se inserta con uno o más sitios fGly conjugados con una construcción de fármaco-enlazador, tal como se describe en la presente, y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 u 87, y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se inserta con uno o más sitios fGly conjugados con una construcción de fármaco-enlazador, tal como se describe en la presente, y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 u 87, y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:27, (ii) SEQ ID NO:31, (iii) SEQ ID NO:32, (iv) SEQ

ID NO:35, y (v) SEQ ID NO:39; (2) una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:2, (ii) SEQ ID NO:9, (iii) SEQ ID NO:14, (iv) SEQ ID NO:16, y (v) SEQ ID NO:22; y (3) una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:3, (ii) SEQ ID NO:10, (iii) SEQ ID NO:17, y (iv) SEQ ID NO:23; y/o una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:28, (ii) SEQ ID NO:33, (iii) SEQ ID NO:36, y (iv) SEQ ID NO:40; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:12, (ii) SEQ ID NO:29, y (iii) SEQ ID NO:37; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:30, (ii) SEQ ID NO:34, y (iii) SEQ ID NO:38.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una región VH que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:27, (ii) SEQ ID NO:31, (iii) SEQ ID NO:32, (iv) SEQ ID NO:35, y (v) SEQ ID NO:39; (2) una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:2, (ii) SEQ ID NO:9, (iii) SEQ ID NO:14, (iv) SEQ ID NO:16, y (v) SEQ ID NO:22; y (3) una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:3, (ii) SEQ ID NO:10, (iii) SEQ ID NO:17, y (iv) SEQ ID NO:23.

En algunas modalidades, un anticuerpo contra TF comprende una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:28, (ii) SEQ ID NO:33, (iii) SEQ ID NO:36, y (iv) SEQ ID NO:40; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:12, (ii) SEQ ID NO:29, y (iii) SEQ ID NO:37; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de: (i) SEQ ID NO:30, (ii) SEQ ID NO:34, y (iii) SEQ ID NO:38.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende: una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:28, 33, 36 y 40; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:12, 29 y 37; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:30, 34 y 38.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:28; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende: (a) una región VH que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:27; y (b) una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:28,

33, 36 y 40; (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:12, 29 y 37; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:30, 34 y 38.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende: (a) una región VH que comprende: (1) una CDR1 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:27; y (b) una región VL que comprende: (1) una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:28; y (2) una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29; y (3) una CDR3 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30.

En algunas modalidades, un TF-ADC se prepara a partir de un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41, y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42.

En algunas modalidades, un TF-ADC se prepara a partir de un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se inserta con uno o más sitios fGly y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:78 u 81 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42. En algunas modalidades, un TF-ADC se prepara a partir de un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se inserta con uno o más sitios fGly y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:78 u 81 y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se conjuga con uno o más sitios fGly conjugados con una construcción de fármaco-enlazador, tal como se describe en la presente, y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 u 87, y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que se conjuga con uno o más sitios fGly conjugados con una construcción de fármaco-enlazador, tal como se describe en la presente, y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84 u 87, y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92.

En algunas modalidades, la posición de una o más (por ejemplo, una, dos, tres) CDR a lo largo de la región VH (por ejemplo, CDR1, CDR2 o CDR3) y/o VL (por ejemplo, CDR1, CDR2 o CDR3) de un anticuerpo contra TF puede variar en una, dos, tres, cuatro, cinco o seis posiciones de aminoácidos, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). Por ejemplo, en algunas modalidades, la posición

que define una CDR de cualquiera de la **Tabla 1** o la **Tabla 2** puede variar desplazando el límite del extremo N y/o el extremo C de la CDR en uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos, con respecto a la posición actual de la CDR, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). Adicionalmente o alternativamente, en algunas modalidades, la longitud de una o más (por ejemplo, una, dos, tres) CDR a lo largo de la región VH (por ejemplo, CDR1, CDR2 o CDR3) y/o VL (por ejemplo, CDR1, CDR2 o CDR3) de un anticuerpo contra TF (por ejemplo, un anticuerpo contra TF humano) descrito en la presente puede variar (por ejemplo, ser más corta o más larga) en uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). Por ejemplo, en algunas modalidades, una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos más corta que una o más de las CDR descritas por las SEQ ID NO:1-24 y 27-40, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). En otras modalidades, una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos más larga que una o más de las CDR descritas por las SEQ ID NO:1-24 y 27-40, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). Adicionalmente o alternativamente, en algunas modalidades, el extremo amino de una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL puede extenderse uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos en comparación con una o más de las CDR descritas por las SEQ ID NO:1-24 y 27-40, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). Adicionalmente o alternativamente, en algunas modalidades, el extremo carboxi de una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL puede extenderse uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos en comparación con una o más de las CDR descritas por las SEQ ID NO:1-24 y 27-40, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). Adicionalmente o alternativamente, en algunas modalidades, el extremo amino de una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL puede acortarse uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos en comparación con una o más de las CDR descritas por las SEQ ID NO:1-24 y 27-40, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %).

En algunas modalidades, el extremo carboxi de una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL puede acortarse uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos en comparación con una o más de las CDR descritas por las SEQ ID NO:1-24 y 27-40, siempre que se mantenga la unión a TF (por ejemplo, TF humano) (por ejemplo, se mantenga sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para determinar si se mantiene la unión a TF (por ejemplo, TF humano), por ejemplo, los ensayos y condiciones de unión descritos en la sección «Ejemplos» descrita en la presente.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF que comprende una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o más) modificaciones de secuencia conservadoras. Con respecto a los polipéptidos que son anticuerpos contra TF, como los anticuerpos contra TF humanos, las modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos conservadoras en las que un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias se describen en la presente. Por lo tanto, en algunas modalidades, un residuo de aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo contra TF puede reemplazarse con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la unión del antígeno y los nucleótidos que la codifican son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)). En algunas modalidades, las modificaciones de secuencia conservadoras descritas en la presente modifican las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo contra TF (por ejemplo, un anticuerpo contra TF humano) en 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %. En algunas modalidades, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos se refieren a como máximo una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos en las CDR, tales como las descritas en cualquiera de las **Tablas 1-2**. Por lo tanto, por ejemplo, cada una de dichas CDR puede contener hasta 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ejemplo, hasta (no más de) 4 sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ejemplo hasta (no más de) 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ejemplo hasta (no más de) 2 sustituciones de aminoácidos conservadoras, o no más de 1 sustitución de aminoácidos conservadora. En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF que contiene uno o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR) que tienen al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con Iss CDR de EXMA006 o EXMA007 (véanse, por ejemplo, las **Tablas 1-2**). En algunas modalidades, un TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF que contiene una VH y una VL que comprenden CDR idénticas a las de EXMA006 o EXMA007 (véanse, por ejemplo, las **Tablas 1-2**). En algunas

modalidades, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos no incluyen ninguna modificación dentro de un residuo determinante de especificidad (SDR). En algunas modalidades, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos no incluyen ninguna modificación dentro de una CDR (tal como CDR1, CDR2, CDR3 o cualquier combinación de estas). En modalidades adicionales, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos se encuentran en la región marco o constante.

En algunas modalidades, el anticuerpo en un TF-ADC comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:25 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:26, y la unión del anticuerpo a TF (por ejemplo, TF humano) se mantiene (por ejemplo, se mantiene sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %).

En algunas modalidades, el anticuerpo en un TF-ADC comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:41 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:42, y la unión del anticuerpo a TF (por ejemplo, TF humano) se mantiene (por ejemplo, se mantiene sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %).

En algunas modalidades, el anticuerpo en un TF-ADC comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO:77-90 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:91 o 92, y la unión del anticuerpo a TF (por ejemplo, TF humano) se mantiene (por ejemplo, se mantiene sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). En algunas modalidades, el anticuerpo en un TF-ADC comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:93 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:91, y la unión del anticuerpo a TF (por ejemplo, TF humano) se mantiene (por ejemplo, se mantiene sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %). En algunas modalidades, el anticuerpo en un TF-ADC comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID

NO:94 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO:92, y la unión del anticuerpo a TF (por ejemplo, TF humano) se mantiene (por ejemplo, se mantiene sustancialmente, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %).

En algunas modalidades, el anticuerpo en el TF-ADC compite con el anticuerpo designado como EXMA-006. Además o alternativamente, el anticuerpo en el TF-ADC compite con el anticuerpo designado como EXMA-007. En algunas modalidades, el anticuerpo en el TF-ADC compite con cualquier anticuerpo contra TF, tal como se describe en la presente.

Además, se proporciona un ácido nucleico que codifica un agente de unión a TF (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo), un ácido nucleico complementario a este, un vector que comprende un ácido nucleico, tal como se describe en la presente, una célula que comprende un ácido nucleico o un vector, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, la célula expresa el agente de unión a TF. En algunas modalidades, la célula replica el ácido nucleico o el vector. En algunas modalidades, se proporcionan, además, materiales para generar anticuerpos contra TF, incluidos anticuerpos contra TF humanos, útiles para la preparación de ADC. En este sentido, una célula (por ejemplo, una célula aislada) puede producir un anticuerpo que comprende una VH y una VL, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, un polinucleótido puede comprender una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo contra TF o un fragmento de anticuerpo. En algunas modalidades, el polinucleótido es un polinucleótido aislado y/o recombinante. En algunas modalidades, el polinucleótido aislado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y/o una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde la VH y la VL comprenden CDR idénticas a las CDR que se describen en la presente.

En algunas modalidades, uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) pueden comprender uno o más polinucleótidos para la expresión de uno o más polinucleótidos en una célula hospedadora adecuada. Dichos vectores son útiles, por ejemplo, para amplificar los polinucleótidos en células hospedadoras para crear cantidades útiles de estos, y para expresar agentes de unión, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, mediante el uso de técnicas recombinantes.

En algunas modalidades, uno o más vectores son vectores de expresión en donde uno o más polinucleótidos están enlazados operativamente a uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias de control de expresión. Se contemplan específicamente construcciones de expresión recombinantes de replicación autónoma, tales como vectores de ADN viral y plásmido que incorporan uno o más polinucleótidos que codifican secuencias de anticuerpos que se unen a TF. Las secuencias de ADN de control de expresión incluyen promotores, potenciadores y operadores, y generalmente se seleccionan en función de los sistemas de expresión en los que

se utilizará la construcción de expresión. Las secuencias promotoras y potenciadoras generalmente se seleccionan por su capacidad de aumentar la expresión génica, mientras que las secuencias operadoras generalmente se seleccionan por su capacidad de regular la expresión génica. Las construcciones de expresión también pueden incluir secuencias que codifican uno o más marcadores seleccionables que permiten la identificación de células hospedadoras que portan la construcción. Las construcciones de expresión también pueden incluir secuencias que facilitan, por ejemplo, promueven, la recombinación homóloga en una célula hospedadora. En algunas modalidades, las construcciones de expresión también incluyen secuencias necesarias para la replicación en una célula hospedadora.

En algunas modalidades, una secuencia de control de expresión puede incluir una secuencia promotora/potenciadora, por ejemplo, promotor/potenciador de citomegalovirus (Lehner et al., *J. Clin. Microbiol.*, 29:2494-2502, 1991; Boshart et al., *Cell*, 41:521-530, 1985); promotor del virus del sarcoma de Rous (Davis et al., *Hum. Gene Ther.*, 4:151, 1993); promotor Tie (Korhonen et al., *Blood*, 86(5):1828-1835, 1995); promotor del virus simio 40; DRA (regulado por disminución en el adenoma; Alrefai et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293:G923-G934, 2007); MCT1 (transportador de monocarboxilato 1; Cuff et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, G977-G979, 2005); y Math1 (homólogo atonal de ratón 1; Shroyer et al., *Gastroenterology*, 132: 2477-2478, 2007), para la expresión en células de mamíferos, donde el promotor está enlazado operativamente antes (por ejemplo, hacia 5') de una secuencia codificante de polipéptido. En algunas modalidades, un promotor puede ser un promotor específico del epitelio o un promotor específico del endotelio. Un polinucleótido también puede incluir opcionalmente una secuencia de poliadenilación adecuada (por ejemplo, la secuencia de poliadenilación del gen SV40 o de la hormona de crecimiento humana) enlazada operativamente después (por ejemplo, hacia 3') de la secuencia codificante del polipéptido.

En cualquier modalidad, uno o más polinucleótidos pueden comprender, además, opcionalmente, una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más péptidos señal secretorios fusionados en marco con las secuencias de polipéptidos. Los uno o más péptidos señal secretorios pueden dirigir la secreción de los polipéptidos de anticuerpos por las células que expresan uno o más polinucleótidos, y pueden escindirse mediante la célula a partir del polipéptido secretado. En cualquier modalidad, uno o más polinucleótidos pueden comprender, además, opcionalmente una o más secuencias cuya única función prevista es facilitar la producción a gran escala del vector.

Los vectores de expresión pueden prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante estándar descritas, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2.^a edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (1994). Opcionalmente, los vectores virales se vuelven deficientes en replicación, por

ejemplo, eliminando o interrumpiendo genes selectos necesarios para la replicación viral.

Una célula puede comprender uno o más polinucleótidos y/o uno o más vectores. Por ejemplo, en cualquier modalidad, una célula puede transformarse o transfectarse con uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo contra TF (por ejemplo, un anticuerpo contra TF humano) o uno o más vectores que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican un anticuerpo contra TF (por ejemplo, un anticuerpo contra TF humano). En algunas modalidades, una célula puede expresar un anticuerpo contra TF (por ejemplo, un anticuerpo contra TF humano) que contiene una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR que tienen al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las CDR que se describen en la presente, tal como EXMA006 o EXMA007 (véanse, por ejemplo, las **Tablas 1-2**). En algunas modalidades, una célula puede expresar un anticuerpo contra TF (por ejemplo, un anticuerpo contra TF humano) que contiene regiones VH y regiones VL que comprenden CDR idénticas a las descritas en la presente, tales como EXMA006 o EXMA007 (véanse, por ejemplo, las **Tablas 1-2**). Las células adecuadas para generar un anticuerpo contra TF, tal como se describe en la presente, incluyen células procariotas, tales como *Escherichia coli* (véase, por ejemplo, Plückthun et al., *Methods Enzymol.*, 178:497-515, 1989), y células eucariotas, tales como una célula animal (por ejemplo, una célula de mieloma, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula de hibridoma), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) o una célula vegetal (por ejemplo, una célula de tabaco, maíz, soja o arroz). El uso de células hospedadoras de mamíferos puede proporcionar modificaciones traduccionales (por ejemplo, glicosilación, truncamiento, lipidación y fosforilación) que pueden ser convenientes para conferir una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinante. De manera similar, en cualquier modalidad, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra TF, incluido un anticuerpo contra TF humano) puede estar glicosilado o no glicosilado y/o haber sido modificado covalentemente para incluir uno o más accesorios de polímero solubles en agua tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol.

Los métodos para introducir ADN o ARN en una célula hospedadora son bien conocidos e incluyen, de modo no taxativo, transformación, transfección, electroporación, inyección nuclear y fusión con portadores tales como liposomas, micelas, células fantasma y protoplastos. Dichas células hospedadoras son útiles para amplificar polinucleótidos y para expresar polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) codificados por los polinucleótidos. En este sentido, un proceso para producir un anticuerpo contra TF puede comprender la introducción de ARN o ADN que codifica un anticuerpo contra TF, tal como se describe en la presente, en una célula hospedadora, el cultivo de la célula hospedadora y el aislamiento del anticuerpo contra TF producido de este modo.

En general, se conocen diversos métodos para producir un anticuerpo a partir de un polinucleótido. Por ejemplo, los procedimientos básicos de biología molecular se describen en

Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989 (véase también Maniatis et al, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 2001). Además, numerosas publicaciones describen técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos mediante manipulación de ADN, creación de vectores de expresión y transformación y cultivo de células apropiadas (véase, por ejemplo, Mountain y Adair, Capítulo 1 en *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Tombs ed., Intercept, Andover, Reino Unido, 1992); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel ed., Wiley Interscience, Nueva York, 1999).

En determinadas modalidades, la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo contra TF se modifica para que incluya un motivo de sulfatasa que contenga un residuo de serina o cisteína que sea capaz de convertirse (oxidarse) en un residuo de 2-formilglicina (fGly) por acción de una enzima generadora de formilglicina (FGE) ya sea *in vivo* (por ejemplo, en el momento de la traducción de una proteína que contiene una etiqueta de aldehído en una célula) o *in vitro* (por ejemplo, al entrar en contacto con una proteína que contiene una etiqueta de aldehído con una FGE en un sistema libre de células). Estos motivos de sulfatasa también pueden mencionarse en la presente como un sitio de modificación de FGE.

Motivos de sulfatasa

Un motivo mínimo de sulfatasa de una etiqueta de aldehído tiene generalmente 5 o 6 residuos de aminoácido de longitud, por lo general no más de 6 residuos de aminoácido de longitud. Los motivos de sulfatasa proporcionados en un polipéptido Ig tienen al menos 5 o 6 residuos de aminoácidos, y pueden ser, por ejemplo, de 5 a 16, 6-16, 5-15, 6-15, 5-14, 6-14, 5-13, 6-13, 5-12, 6-12, 5-11, 6-11, 5-10, 6-10, 5-9, 6-9, 5-8 o 6-8 residuos de aminoácidos de longitud, para definir un motivo de sulfatasa de menos de 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 o 6 residuos de aminoácido de longitud.

En determinadas modalidades, los anticuerpos contra TF de interés incluyen aquellos donde uno o más residuos de aminoácido, tal como 2 o más, o 3 o más, o 4 o más, o 5 o más, o 6 o más, o 7 o más, o 8 o más, o 9 o más, o 10 o más, o 11 o más, o 12 o más, o 13 o más, o 14 o más, o 15 o más, o 16 o más, o 17 o más, o 18 o más, o 19 o más, o 20 o más residuos de aminoácido se insertaron, eliminaron, sustituyeron (reemplazaron) con respecto a la secuencia de aminoácidos natural para proporcionar una secuencia de un motivo de sulfatasa en el anticuerpo contra TF. En determinadas modalidades, el anticuerpo contra TF incluye una modificación (inserción, adición, eliminación y/o sustitución/reemplazo) de menos de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos natural del anticuerpo contra TF. Cuando una secuencia de aminoácidos natural del anticuerpo contra TF contiene uno o más residuos del motivo de sulfatasa deseado, el número total de modificaciones de residuos se puede reducir, por ejemplo, mediante modificación de la especificación del sitio (inserción, adición, eliminación,

sustitución/reemplazo) de los residuos de aminoácidos que flanquean los residuos de aminoácidos naturales para proporcionar una secuencia del motivo de sulfatasa deseado. En determinadas modalidades, se minimiza el grado de modificación de la secuencia de aminoácidos natural del anticuerpo diana, a fin de minimizar el número de residuos de aminoácidos que se insertan, eliminan, sustituyen (reemplazan) o agregan (por ejemplo, al extremo N o C). Al minimizar el alcance de la modificación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo diana, se puede minimizar el impacto que dichas modificaciones puedan tener sobre la función y/o estructura del anticuerpo.

Cabe señalar que, si bien las etiquetas de aldehído de particular interés son aquellas que comprenden al menos un motivo mínimo de sulfatasa (también denominado «motivo de sulfatasa de consenso»), se apreciará fácilmente que la presente descripción contempla y abarca las etiquetas de aldehído más largas y pueden ser útiles en las composiciones y los métodos de la presente descripción. Las etiquetas de aldehído pueden comprender un motivo mínimo de sulfatasa de 5 o 6 residuos, o pueden ser más largas y comprender un motivo mínimo de sulfatasa que puede flanquearse en los lados del extremo N y/o C del motivo con residuos de aminoácidos adicionales. Se contemplan etiquetas de aldehído de, por ejemplo, 5 o 6 residuos de aminoácidos, así como secuencias de aminoácidos más largas de más de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más residuos de aminoácidos.

Una etiqueta de aldehído puede estar presente en el extremo C o cerca de este de una cadena pesada de Ig; por ejemplo, una etiqueta de aldehído puede estar presente dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del extremo C de una cadena pesada de Ig nativa de tipo salvaje. Una etiqueta de aldehído puede estar presente dentro de un dominio CH1 de una cadena pesada de Ig. Una etiqueta de aldehído puede estar presente dentro de un dominio CH2 de una cadena pesada de Ig. Una etiqueta de aldehído puede estar presente dentro de un dominio CH3 de una cadena pesada de Ig. Una etiqueta de aldehído puede estar presente en una región constante de cadena ligera de Ig, por ejemplo, en una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda.

En determinadas modalidades, el motivo de sulfatasa utilizado puede describirse mediante la fórmula:

$$X^1Z^{10}X^2Z^{20}X^3Z^{30} \quad (V)$$

donde

Z^{10} es cisteína o serina (que también puede representarse mediante (C/S));

Z^{20} es un residuo de prolina o alanina (que también puede representarse mediante (P/A));

Z^{30} es un aminoácido básico (por ejemplo, arginina (R), y puede ser lisina (K) o histidina (H), por ejemplo, lisina), o un aminoácido alifático (alanina (A), glicina (G), leucina (L), valina (V), isoleucina (I), o prolina (P), por ejemplo, A, G, L, V o I;

X^1 está presente o ausente y, cuando está presente, puede ser cualquier aminoácido, por

ejemplo, un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar, sin carga (es decir, distinto de un aminoácido aromático o un aminoácido cargado), por ejemplo, L, M, V, S o T, por ejemplo, L, M, S o V, con la condición de que cuando el motivo de sulfatasa esté en el extremo N del anticuerpo contra TF diana, X^1 esté presente; y

X^2 y X^3 pueden ser independientemente cualquier aminoácido, aunque generalmente un aminoácido alifático, un aminoácido polar, sin carga, o un aminoácido que contiene azufre (es decir, que no sea un aminoácido aromático o un aminoácido con carga), por ejemplo, S, T, A, V, G o C, por ejemplo, S, T, A, V o G.

La secuencia de aminoácidos de una cadena pesada y/o ligera de anticuerpos puede modificarse para proporcionar una secuencia de al menos 5 aminoácidos con la fórmula $X^1Z^{10}X^2Z^{20}X^3Z^{30}$, donde

Z^{10} es cisteína o serina;

Z^{20} es un residuo de prolina o alanina;

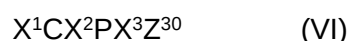
Z^{30} es un aminoácido alifático o un aminoácido básico;

X^1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, con la condición de que cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en un extremo N del anticuerpo contra TF, X^1 está presente;

cada uno de X^2 y X^3 es independientemente cualquier aminoácido.

El motivo de sulfatasa generalmente se selecciona de modo que sea capaz de ser convertido por una FGE seleccionada, por ejemplo, una FGE presente en una célula hospedadora en la que se expresa el anticuerpo marcado con aldehído o una FGE que se pondrá en contacto con el anticuerpo marcado con aldehído en un método *in vitro* sin células.

Por ejemplo, cuando la FGE es una FGE eucariota (por ejemplo, una FGE de mamíferos, incluida una FGE humana), el motivo de sulfatasa puede tener la fórmula:



donde

X^1 puede estar presente o ausente y, cuando está presente, puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar sin carga (es decir, que no sea un aminoácido aromático o un aminoácido con carga), por ejemplo, L, M, S o V, con la condición de que, cuando el motivo de la sulfatasa está en el extremo N del anticuerpo contra TF diana, X^1 está presente;

X^2 y X^3 pueden ser independientemente cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar sin carga (es decir, que no sea un aminoácido aromático o un aminoácido con carga), por ejemplo, S, T, A, V, G o C, por ejemplo, S, T, A, V o G; y

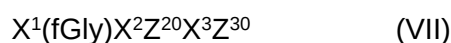
Z^{30} es un aminoácido básico (por ejemplo, arginina (R), y puede ser lisina (K) o histidina (H), por ejemplo, lisina), o un aminoácido alifático (alanina (A), glicina (G), leucina (L), valina (V),

isoleucina (I), o prolina (P), por ejemplo, A, G, L, V, o I.

Los ejemplos específicos de motivos de sulfatasa incluyen LCTPSR (SEQ ID NO:100), MCTPSR (SEQ ID NO:101), VCTPSR (SEQ ID NO:102), LCSPSR (SEQ ID NO:103), LCAPSR (SEQ ID NO:104), LCVPSR (SEQ ID NO:105), LCGPSR (SEQ ID NO:106), ICTPAR (SEQ ID NO:107), LCTPSK (SEQ ID NO:108), MCTPSK (SEQ ID NO:109), VCTPSK (SEQ ID NO:110), LCSPSK (SEQ ID NO:111), LCAPSK (SEQ ID NO:112), LCVPSK (SEQ ID NO:113), LCGPSK (SEQ ID NO:114), LCTPSA (SEQ ID NO:115), ICTPAA (SEQ ID NO:116), MCTPSA (SEQ ID NO:117), VCTPSA (SEQ ID NO:118), LCSPSA (SEQ ID NO:119), LCAPSA (SEQ ID NO:120), LCVPSA (SEQ ID NO:121), y LCGPSA (SEQ ID NO:122).

Secuencias que contienen fGly

Tras la acción de la FGE en la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo, la serina o la cisteína en el motivo de sulfatasa se modifica para fGly. Por lo tanto, el motivo de sulfatasa que contiene fGly puede tener la fórmula:



donde

fGly es el residuo de formilglicina;

Z^{20} es un residuo de prolina o alanina (que también puede representarse mediante (P/A));

Z^{30} es un aminoácido básico (por ejemplo, arginina (R), y puede ser lisina (K) o histidina (H), usualmente, lisina), o un aminoácido alifático (alanina (A), glicina (G), leucina (L), valina (V), isoleucina (I), o prolina (P), por ejemplo, A, G, L, V, o I;

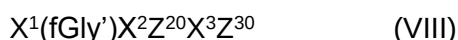
X^1 puede estar presente o ausente y, cuando está presente, puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar sin carga (es decir, que no sea un aminoácido aromático o un aminoácido con carga), por ejemplo, L, M, V, S o T, por ejemplo, L, M o V, con la condición de que, cuando el motivo de la sulfatasa está en el extremo N del polipéptido diana, X^1 está presente; y

X^2 y X^3 pueden ser independientemente cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar sin carga (es decir, que no sea un aminoácido aromático o un aminoácido con carga), por ejemplo, S, T, A, V, G o C, por ejemplo, S, T, A, V o G.

Los ejemplos específicos de motivos de sulfatasa que contienen fGly incluyen L(fGly)TPSR (SEQ ID NO:123), M(fGly)TPSR (SEQ ID NO:124), V(fGly)TPSR (SEQ ID NO:125), L(fGly)SPSR (SEQ ID NO:126), L(fGly)APSR (SEQ ID NO:127), L(fGly)VPSR (SEQ ID NO:128), L(fGly)GPSR (SEQ ID NO:129), I(fGly)TPAR (SEQ ID NO:130), L(fGly)TPSK (SEQ ID NO:131), M(fGly)TPSK (SEQ ID NO:132), V(fGly)TPSK (SEQ ID NO:133), L(fGly)SPSK (SEQ ID NO:134), L(fGly)APSK (SEQ ID NO:135), L(fGly)VPSK (SEQ ID NO:136), L(fGly)GPSK (SEQ ID NO:137), L(fGly)TPSA (SEQ ID NO:138), I(fGly)TPAA (SEQ ID NO:139), M(fGly)TPSA (SEQ ID NO:140), V(fGly)TPSA (SEQ ID NO:141), L(fGly)SPSA (SEQ ID NO:142), L(fGly)APSA (SEQ ID NO:143), L(fGly)VPSA (SEQ

ID NO:144), y L(fGly)GPSA (SEQ ID NO:145).

Tal como se describió anteriormente, para producir el conjugado, el anticuerpo contra TF que contiene el residuo fGly se puede conjugar con un fármaco o agente activo mediante la reacción de fGly con un resto reactiv (por ejemplo, un resto de conjugación hidrazinil-indolilo o hidrazinil-pirrollo-piridinilo, tal como se describió anteriormente) de un enlazador unido al fármaco o agente activo para producir un motivo de sulfatasa que contiene fGly'. Tal como se usa en la presente, el término fGly' hace referencia al residuo de aminoácido del motivo de sulfatasa que está acoplado al fármaco o agente activo a través de un enlazador (por ejemplo, un enlazador ramificado), tal como se describe en la presente. Por lo tanto, el motivo de sulfatasa que contiene fGly' puede tener la fórmula:



donde

fGly' es el residuo de aminoácido acoplado al fármaco o agente activo a través de un enlazador (por ejemplo, un enlazador ramificado), tal como se describe en la presente;

Z²⁰ es un residuo de prolina o alanina (que también puede representarse mediante (P/A));

Z³⁰ es un aminoácido básico (por ejemplo, arginina (R), y puede ser lisina (K) o histidina (H), usualmente, lisina), o un aminoácido alifático (alanina (A), glicina (G), leucina (L), valina (V), isoleucina (I), o prolina (P), por ejemplo, A, G, L, V, o I;

X¹ puede estar presente o ausente y, cuando está presente, puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar sin carga (es decir, que no sea un aminoácido aromático o un aminoácido con carga), por ejemplo, L, M, V, S o T, por ejemplo, L, M o V, con la condición de que, cuando el motivo de la sulfatasa está en el extremo N del polipéptido diana, X¹ está presente; y

X² y X³ pueden ser independientemente cualquier aminoácido, por ejemplo, un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar sin carga (es decir, que no sea un aminoácido aromático o un aminoácido con carga), por ejemplo, S, T, A, V, G o C, por ejemplo, S, T, A, V o G.

Los ejemplos específicos de motivos de sulfatasa que contienen fGly' incluyen L(fGly')TPSR (SEQ ID NO:146), M(fGly')TPSR (SEQ ID NO:147), V(fGly')TPSR (SEQ ID NO:148), L(fGly')SPSR (SEQ ID NO:149), L(fGly')APSR (SEQ ID NO:150), L(fGly')VPSR (SEQ ID NO:151), L(fGly')GPSR (SEQ ID NO:152), I(fGly')TPAR (SEQ ID NO:153), L(fGly')TPSK (SEQ ID NO:154), M(fGly')TPSK (SEQ ID NO:155), V(fGly')TPSK (SEQ ID NO:156), L(fGly')SPSK (SEQ ID NO:157), L(fGly')APSK (SEQ ID NO:158), L(fGly')VPSK (SEQ ID NO:159), L(fGly')GPSK (SEQ ID NO:160), L(fGly')TPSA (SEQ ID NO:161), I(fGly')TPAA (SEQ ID NO:162), M(fGly')TPSA (SEQ ID NO:163), V(fGly')TPSA (SEQ ID NO:164), L(fGly')SPSA (SEQ ID NO:165), L(fGly')APSA (SEQ ID NO:166), L(fGly')VPSA (SEQ ID NO:167), y L(fGly')GPSA (SEQ ID NO:168).

Tal como se indicó anteriormente, la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se modifica para que incluya un motivo de sulfatasa que contenga un residuo de serina o cisteína que sea capaz de convertirse (oxidarse) en un residuo de fGly por acción de una FGE ya sea *in vivo* (por ejemplo, en el momento de la traducción de una proteína que contiene una etiqueta de aldehído en una célula) o *in vitro* (por ejemplo, al entrar en contacto con una proteína que contiene una etiqueta de aldehído con una FGE en un sistema libre de células). El anticuerpo utilizado para generar un conjugado de la presente descripción incluye al menos una región constante de Ig, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de Ig (por ejemplo, al menos un dominio de CH1; al menos un dominio de CH1 y un dominio de CH2; un dominio de CH1, CH2 y CH3; o un dominio de CH1, CH2, CH3 y CH4), o una región constante de cadena ligera de Ig. Dichos anticuerpos de Ig se denominan en la presente «polipéptidos Ig diana» o «anticuerpos diana».

El sitio de un anticuerpo en el que se introduce un motivo de sulfatasa puede ser cualquier sitio conveniente. Tal como se señaló anteriormente, en algunos casos, se minimiza el grado de modificación de la secuencia de aminoácidos natural del polipéptido diana, a fin de minimizar el número de residuos de aminoácido que se insertan, eliminan, sustituyen (reemplazan) y/o agregan (por ejemplo, en el extremo N o C). Al minimizar el alcance de la modificación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo diana, se puede minimizar el impacto que dichas modificaciones puedan tener sobre la función y/o estructura del anticuerpo.

Una región constante de cadena pesada de anticuerpos puede incluir regiones constantes de Ig de cualquier isotipo de cadena pesada, regiones constantes de cadena pesada de Ig no naturales (incluidas las regiones constantes de cadena pesada de Ig de consenso). Una secuencia de aminoácidos de la región constante de Ig se puede modificar para que incluya una etiqueta de aldehído, donde la etiqueta de aldehído está presente en una región de bucle accesible a disolvente, o adyacente a esta, de la región constante de Ig. Una secuencia de aminoácidos de la región constante de Ig se puede modificar mediante la inserción y/o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos, o más de 16 aminoácidos, para proporcionar una secuencia de aminoácidos de un motivo de sulfatasa, tal como se describió anteriormente.

En algunos casos, un anticuerpo marcado con aldehído comprende una región constante de cadena pesada de Ig marcada con aldehído (por ejemplo, al menos un dominio de CH1; al menos un dominio de CH1 y un dominio de CH2; un dominio de CH1, CH2 y CH3; o un dominio de CH1, CH2, CH3 y CH4). La región constante de cadena pesada de Ig marcada con aldehído puede incluir secuencias de región constante de cadena pesada de una cadena pesada de isotipo de IgA, IgM, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o cualquier variante alotípica de estas, por ejemplo, secuencias de región constante de cadena pesada humana o secuencias de región constante de cadena pesada de ratón, una región constante de cadena pesada híbrida, una región constante de cadena pesada sintética, o una secuencia de región constante de cadena pesada de consenso, etc., modificada para que incluya al menos un motivo de sulfatasa que puede

modificarse mediante una FGE para generar un polipéptido de Ig modificado por fGly. En la técnica se conocen variantes alotípicas de cadenas pesadas de Ig. Véase, por ejemplo, Jefferis y Lefranc (2009) *MAbs* 1:4.

En algunos casos, un anticuerpo marcado con aldehído comprende una región constante de cadena ligera de Ig marcada con aldehído. La región constante de cadena ligera de Ig marcada con aldehído puede incluir secuencias de regiones constantes de una cadena ligera kappa, una cadena ligera lambda, por ejemplo, regiones constantes de la cadena ligera kappa o lambda humana, una región constante de cadena ligera híbrida, una región constante de cadena ligera sintética o una secuencia de región constante de cadena ligera de consenso, etc., modificada para que incluya al menos un motivo de sulfatasa que puede modificarse mediante una FGE para generar un anticuerpo modificado por fGly. Las regiones constantes ilustrativas incluyen las regiones gamma 1 y gamma 3 humanas. Con la excepción del motivo de sulfatasa, una región constante puede tener una secuencia de aminoácidos de tipo salvaje, o puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos 70 % idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % idéntica) a una secuencia de aminoácidos de tipo salvaje.

En algunas modalidades, el motivo de sulfatasa se encuentra en una posición distinta, o además de, el extremo C de la cadena pesada del polipéptido Ig. Como se señaló anteriormente, un anticuerpo aislado marcado con aldehído puede comprender una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada modificada para que incluya un motivo de sulfatasa, tal como se describió anteriormente, donde el motivo de sulfatasa se encuentra en una región de bucle accesible a la superficie de la región constante de cadena pesada del anticuerpo o adyacente a esta.

Se puede proporcionar un motivo de sulfatasa dentro de una o más de estas secuencias de aminoácidos de dichos sitios de modificación de una cadena pesada de Ig o adyacente a estas. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de cadena pesada de Ig puede modificarse (por ejemplo, cuando la modificación incluye una o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de residuos de aminoácidos) en una o más de estas secuencias de aminoácidos para proporcionar un motivo de sulfatasa adyacente y del extremo N y/o adyacente y del extremo C de estos sitios de modificación. De manera alternativa o adicional, una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de cadena pesada de Ig puede modificarse (por ejemplo, cuando la modificación incluye una o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de residuos de aminoácidos) en una o más de estas secuencias de aminoácidos para proporcionar un motivo de sulfatasa entre dos residuos cualesquiera de los sitios de modificación de la cadena pesada de Ig. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de cadena pesada de Ig puede modificarse para que incluya dos motivos, que pueden ser adyacentes entre sí, o que pueden estar separados por uno, dos, tres, cuatro o más (por ejemplo, de alrededor de 1 a alrededor de 25, de alrededor de 25 a alrededor de 50, o de alrededor de 50 a alrededor de

100, o más, aminoácidos). De manera alternativa o adicional, cuando una secuencia de aminoácidos natural proporciona uno o más residuos de aminoácidos de una secuencia de motivos de sulfatasa, se pueden modificar los residuos de aminoácidos seleccionados de los sitios de modificación de una secuencia de aminoácidos de polipéptidos de cadena pesada de Ig (por ejemplo, cuando la modificación incluye una o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de residuos de aminoácidos) para proporcionar un motivo de sulfatasa en el sitio de modificación.

También pueden utilizarse otros motivos de sulfatasa adecuados y su ubicación en un anticuerpo, como en las publicaciones internacionales n.º WO2012097333, WO2017189432 y WO2018169953, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

Un anticuerpo utilizado en un conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente descripción puede tener cualquiera de una variedad de especificidades de unión al antígeno, incluidos, de modo no taxativo, por ejemplo, un antígeno presente en una célula cancerosa; un antígeno presente en una célula autoinmunitaria; un antígeno presente en un microorganismo patógeno; un antígeno presente en una célula infectada por un virus (por ejemplo, una célula infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana); un antígeno presente en una célula enferma; y similares. Por ejemplo, un conjugado de anticuerpo puede unirse a un antígeno, donde el antígeno está presente en la superficie de la célula. Un anticuerpo conjugado de la presente descripción puede unirse al antígeno con una afinidad de unión adecuada, por ejemplo, de 5×10^{-6} M a 10^{-7} M, de 10^{-7} M a 5×10^{-7} M, de 5×10^{-7} M a 10^{-8} M, De 10^{-8} M a 5×10^{-8} M, de 5×10^{-8} M a 10^{-9} M, o una afinidad de unión superior a 10^{-9} M.

Como ejemplos no taxativos, un anticuerpo conjugado de la presente puede unirse a un antígeno presente en una célula cancerosa (por ejemplo, un antígeno específico de tumores; un antígeno que se sobreexpresa en una célula cancerosa; etc.), y el resto conjugado puede ser un fármaco, tal como un compuesto citotóxico (por ejemplo, una molécula pequeña citotóxica, un péptido sintético citotóxico, etc.). Por ejemplo, un conjugado de anticuerpo de la presente puede ser específico para un antígeno en una célula cancerosa, donde el resto conjugado es un fármaco, tal como un compuesto citotóxico (por ejemplo, una molécula pequeña citotóxica, un péptido sintético citotóxico, etc.).

A modo de otros ejemplos no taxativos, un anticuerpo conjugado puede unirse a un antígeno presente en una célula infectada con un virus (por ejemplo, cuando el antígeno está codificado por el virus; cuando el antígeno se expresa en un tipo de célula infectada por un virus; etc.), y el resto conjugado puede ser un fármaco, tal como un inhibidor de la fusión viral. Por ejemplo, un anticuerpo conjugado del sujeto puede unirse a un antígeno presente en una célula infectada con un virus, y el resto conjugado puede ser un fármaco, tal como un inhibidor de la fusión viral.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que se

ha modificado para incluir un motivo de sulfatasa no convertido (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID No: 100-122) que puede ser y, por lo tanto, tiene la secuencia de aminoácidos de: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPIYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMVDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSLCTPSRNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:77), donde la parte subrayada comprende el motivo de sulfatasa no convertido de la SEQ ID NO:100 pero, en cualquier modalidad, puede reemplazarse con cualquiera de las SEQ ID NO:101-122. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, el residuo K del extremo C de la cadena pesada se elimina, por ejemplo, durante la producción del anticuerpo. Adicionalmente o alternativamente, el motivo de sulfatasa se convierte y se conjuga con un anclador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que ha sido modificada para incluir un residuo de formilglicina y, por lo tanto, tiene la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPIYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMVDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSL(fGly)TPSRNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:78), en donde f(Gly) es el residuo de formilglicina, donde la parte subrayada comprende el motivo de sulfatasa que contiene fGly de la SEQ ID NO:123 pero, en cualquier modalidad, puede reemplazarse con cualquiera de las SEQ ID NO:124-145. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un

péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, el residuo K del extremo C de la cadena pesada se elimina, por ejemplo, durante la producción del anticuerpo. Adicionalmente o alternativamente, el motivo de sulfatasa se conjuga con un enlazador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
 QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMVDWVGQGTITVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSL(fGly')TPSRNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:79), en donde (fGly') es un aminoácido que
 tiene su cadena lateral reemplazada con un enlazador-fármaco descrito en la presente, por
 ejemplo, el ADC con la Fórmula (I) o la Fórmula (II). En la SEQ ID NO:79, la parte subrayada
 comprende el motivo de sulfatasa que contiene fGly' de la SEQ ID NO:146 pero, en cualquier
 modalidad, puede reemplazarse con cualquiera de las SEQ ID NO:147-168. En modalidades
 adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia
 de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las
 cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en
 su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no
 comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N.
 Adicionalmente o alternativamente, el residuo K del extremo C de la cadena pesada se elimina,
 por ejemplo, durante la producción del anticuerpo.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que ha
 sido modificada para incluir dos motivos de sulfatasa no convertidos (por ejemplo, L(C/S)TPSR,
 SEQ ID NO:99) y, por lo tanto, tiene la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
 QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMVDWVGQGTITVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALCTPSRGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPGSLCTPSRGS (SEQ ID NO:80), donde las partes subrayadas comprenden un motivo de sulfatasa no convertido de la SEQ ID NO:100 pero, en cualquier modalidad, puede reemplazarse independientemente con cualquiera de las SEQ ID NO:101-122. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, cualquiera o ambos de los motivos de sulfatasa se convierte/n y se conjuga/n con un enlazador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que ha sido modificada para incluir dos residuos de formilglicina y, por lo tanto, tiene la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL(fGly)TPSRGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL(fGly)TPSRGS (SEQ ID NO:81), en donde cada f(Gly) es un residuo de formilglicina, donde cada parte subrayada comprende el motivo de sulfatasa que contiene fGly de la SEQ ID NO:123 pero, en cualquier modalidad, uno o ambos pueden reemplazarse independientemente con cualquiera de las SEQ ID NO:124-145. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, cualquiera o ambos de los motivos de sulfatasa se conjuga/n con un enlazador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDVYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL(fGly')TPSRGVHTFPAV

LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL(fGly')TPSRGS (SEQ ID NO:82), en donde cada (fGly') es
un aminoácido que tiene su cadena lateral reemplazada con un enlazador-fármaco descrito en
la presente, por ejemplo, el ADC con la Fórmula (I) o la Fórmula (II). En la SEQ ID NO:82, cada
parte subrayada comprende el motivo de sulfatasa que contiene fGly' de la SEQ ID NO:146 pero,
en cualquier modalidad, uno o ambos pueden reemplazarse independientemente con cualquiera
de las SEQ ID NO:147-168. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una
cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunas
modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un
péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o
ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la
SEQ ID NO:97) en su extremo N.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que ha
sido modificada para incluir un motivo de sulfatasa no convertidos (por ejemplo, L(C/S)TPSR,
SEQ ID NO:99) y tiene la secuencia de aminoácidos de:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPIYSGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMVDWVGQGTITVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSLCTPSRNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:83), donde la parte subrayada comprende el
motivo de sulfatasa no convertido de la SEQ ID NO:100 pero, en cualquier modalidad, puede
reemplazarse con cualquiera de las SEQ ID NO:101-122. En modalidades adicionales, el
anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y
ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En
otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además,
un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o
alternativamente, el residuo K del extremo C de la cadena pesada se elimina, por ejemplo,
durante la producción del anticuerpo. Adicionalmente o alternativamente, el motivo de sulfatasa
se convierte y se conjuga con un anizador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en
la presente.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que se ha modificado para incluir un residuo de formil glicina y tiene la secuencia de aminoácidos QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPIYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSL(fGly)TPSRNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:84), en donde f(Gly) es el residuo de formilglicina, donde la parte subrayada comprende el motivo de sulfatasa que contiene fGly de la SEQ ID NO:123 pero, en cualquier modalidad, puede reemplazarse con cualquiera de las SEQ ID NO:124-145. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, el residuo K del extremo C de la cadena pesada se elimina, por ejemplo, durante la producción del anticuerpo. Adicionalmente o alternativamente, el motivo de sulfatasa se conjuga con un enlazador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPIYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSL(fGly')TPSRNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:85), en donde cada (fGly') es un aminoácido que tiene su cadena lateral reemplazada con un enlazador-fármaco, tal como se describe en la presente, por ejemplo, el ADC con la Fórmula (I) o la Fórmula (II). En la SEQ ID NO:85, la parte subrayada comprende el motivo de sulfatasa que contiene fGly' de la SEQ ID NO:146 pero, en cualquier modalidad, puede reemplazarse con cualquiera de las SEQ ID NO:147-168. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, cualquiera o ambas

de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, el residuo K del extremo C de la cadena pesada se elimina, por ejemplo, durante la producción del anticuerpo.

En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que ha sido modificada para incluir dos motivos de sulfatasa no convertidos (por ejemplo, LCTPSR, SEQ ID NO:100) y tiene la secuencia de aminoácidos de: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPIYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLCTPSRGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGSLLCTPSRGS (SEQ ID NO:86), donde cada parte subrayada comprende el motivo de sulfatasa no convertido de la SEQ ID NO:100, pero, en cualquier modalidad, uno o ambos pueden reemplazarse independientemente con cualquiera de las SEQ ID NO:101-122. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, cualquiera o ambos de los motivos de sulfatasa se convierte/n y se conjuga/n con un enlazador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en la presente.

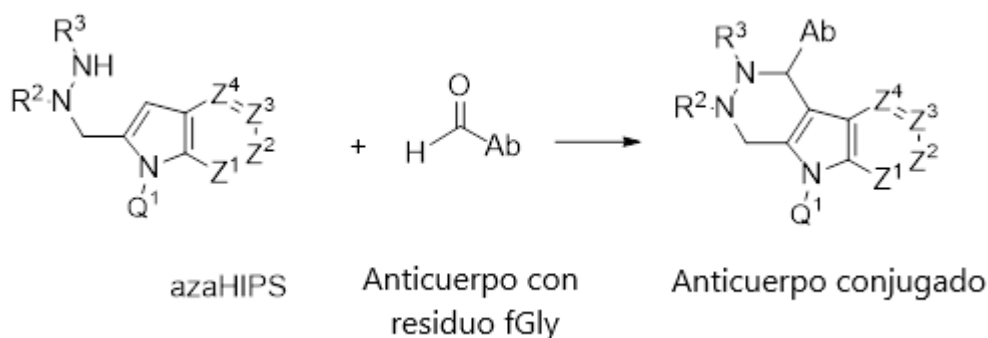
En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF puede tener una cadena pesada que ha sido modificada para incluir dos residuos de formilglicina tiene la secuencia de aminoácidos de: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPIYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL(fGly)TPSRGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL(fGly)TPSRGS (SEQ ID NO:87), en donde f(Gly) es el residuo de formilglicina. En la SEQ ID NO:87, cada parte subrayada comprende un motivo de

sulfatasa que contiene fGly de la SEQ ID NO:123 pero, en cualquier modalidad, uno o ambos pueden reemplazarse con cualquiera de las SEQ ID NO:124-145. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. Adicionalmente o alternativamente, cualquiera o ambos de los motivos de sulfatasa se conjuga/n con un enlazador-carga activa en un TF-ADC, tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, un TF-ADC comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de:

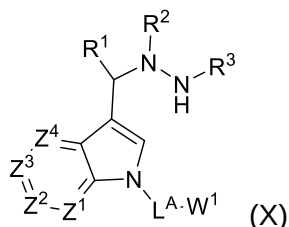
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFDAYGISWVRQAPGQGLEWMGWIAPYSGNTNYA
QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDAGTYSFPGYGMVDWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL(fGly')TPSRGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL(fGly')TPSRGS (SEQ ID NO:88), en donde cada (fGly') es un aminoácido que tiene su cadena lateral reemplazada con un enlazador-fármaco descrito en la presente, por ejemplo, el ADC con la Fórmula (I) o la Fórmula (II). En la SEQ ID NO:88, las partes subrayadas comprenden el motivo de sulfatasa que contiene fGly' de la SEQ ID NO:146 pero, en cualquier modalidad, uno o ambos pueden reemplazarse independientemente con cualquiera de las SEQ ID NO:147-168. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende, además, un péptido señal (tal como SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, la cadenaaa pesada no comprende, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En modalidades adicionales, el anticuerpo comprende, además, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N. En otras modalidades, cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera no comprenden, además, un péptido señal (tal como la SEQ ID NO:97) en su extremo N.

A continuación se muestra un esquema general para acoplar un anticuerpo a una fracción de acoplamiento piridazina-pirrollo.



Una fracción de acoplamiento hidrazinil-pirrólo, que puede denominarse indistintamente en este documento fracción de acoplamiento aza-hidrazino-*iso*-Pictet-Spengler (azaHIPS), tras conjugarse con una formil-glicina, forma una fracción de acoplamiento piridazina-pirrólo como se muestra arriba. Un anticuerpo contra TF puede incluir un residuo de 2-formilglicina (fGly) que reacciona con la fracción de acoplamiento azaHIPS, conjugando así los dos. Para generar un TF-ADC, un fármaco se puede acoplar directa o indirectamente (*por ejemplo*, a través de una fracción enlazadora) a la fracción azaHIPS en cualquier ubicación de la fracción azaHIPS (*por ejemplo*, Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 o Q^1). cada uno de R^2 y R^3 puede ser independientemente cualquier sustituyente deseado, tal como, de modo no taxativo hidrógeno, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido. Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 pueden ser como se describe en este documento, como para la Fórmula (I). Q^1 puede ser $-L^A-W^1$, como se describe en este documento, tal como para la Fórmula (I).

La fórmula (X) a continuación representa una fracción de acoplamiento de hidrazinil-pirrólo que se puede utilizar para unir un anticuerpo contra TF y un fármaco en cualquier TF-ADC descrito en este documento.



en donde:

cada uno de Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 se selecciona independientemente de CR^4 , N y $C-L^B-W^2$, en donde al menos uno de Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 es $C-L^B-W^2$;

R^1 se selecciona de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido;

cada uno de R^2 y R^3 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido, o R^2 y R^3 se enlazan opcionalmente de forma cíclica para formar un heterociclilo de 5 o 6 miembros;

cada R^4 se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, amino, amino sustituido, carboxilo, éster de carboxilo, acilo, aciloxi, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, sulfonilo, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo y heterociclilo sustituido;

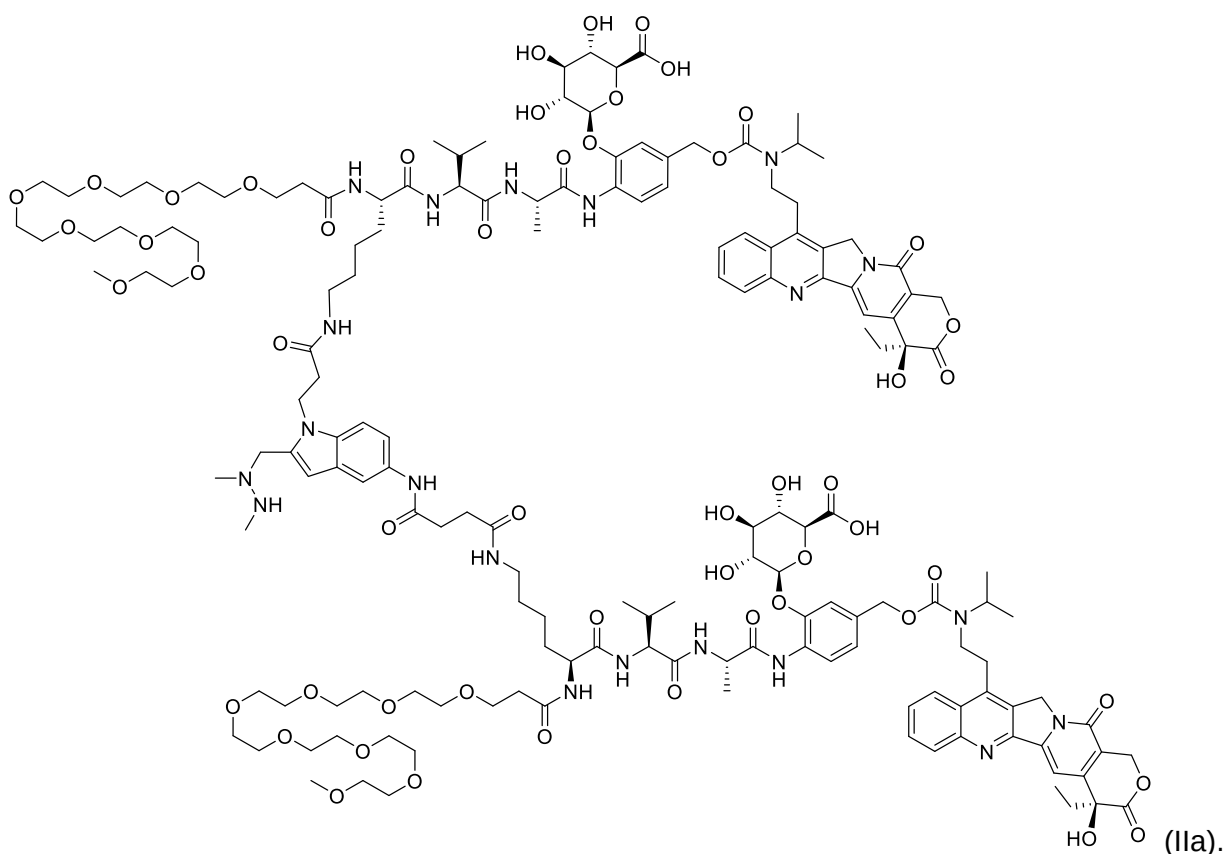
L^A es un primer enlazador como se describe en este documento;

L^B es un segundo enlazador como se describe en este documento;

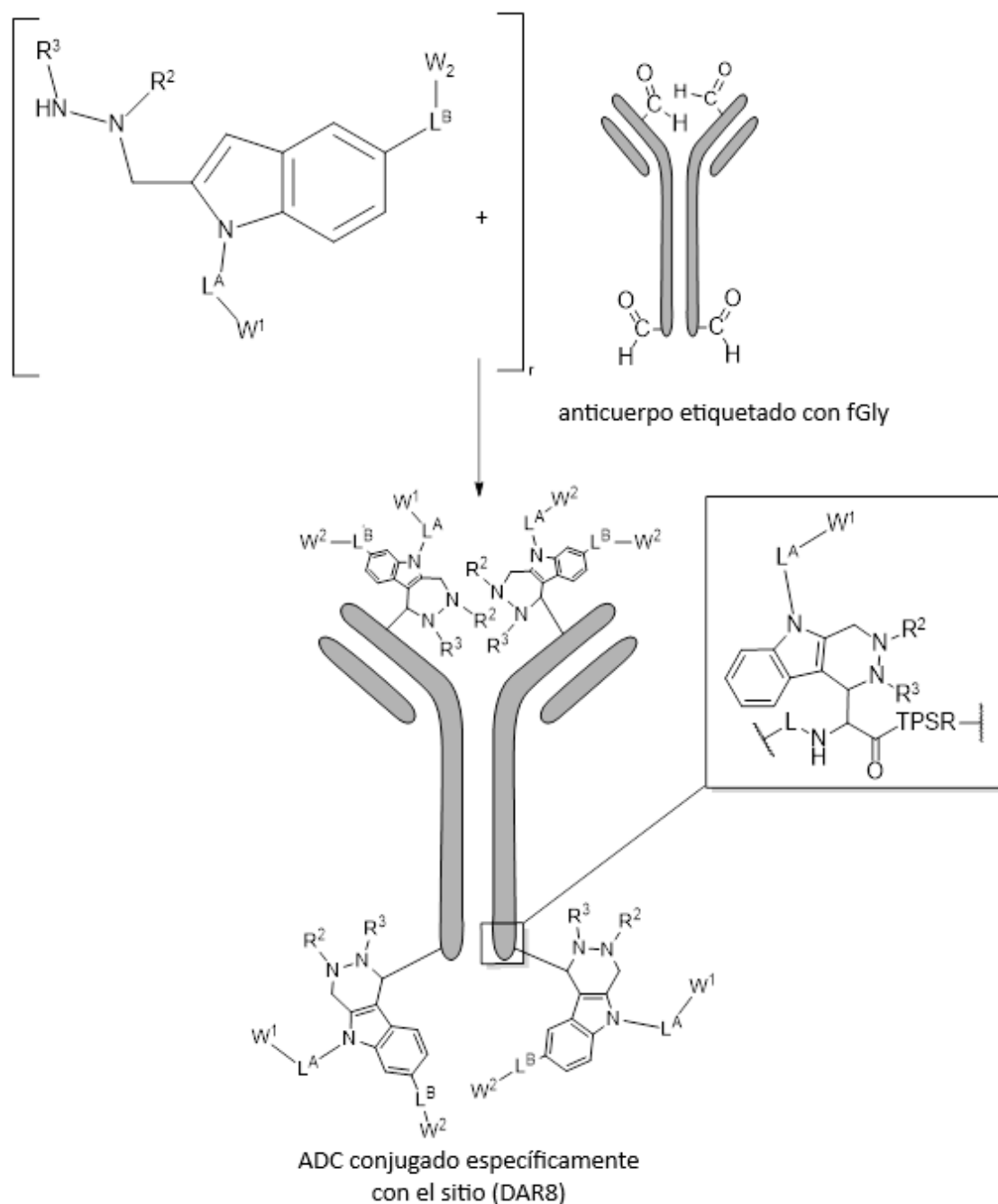
W^1 es un primer fármaco como se describe en este documento; y

W^2 es un segundo fármaco como se describe en este documento.

Por ejemplo, un TF-ADC con la Fórmula (II) puede prepararse conjugando una o más cargas activas de enlazador con la Fórmula (IIa), que se muestran a continuación, con un anticuerpo contra TF:

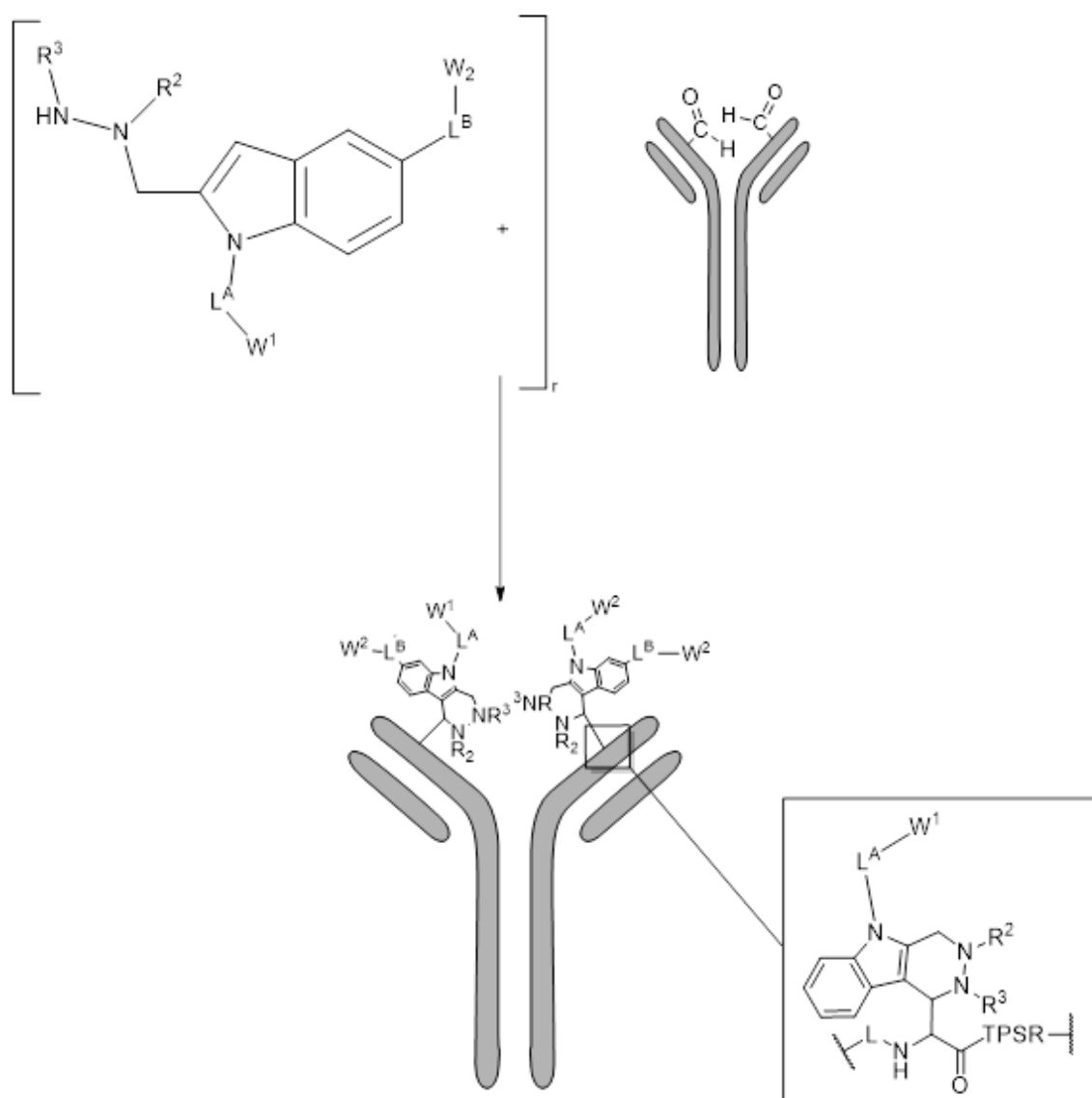


En el **Esquema A** se muestra un esquema ejemplar para fabricar un TF-ADC:

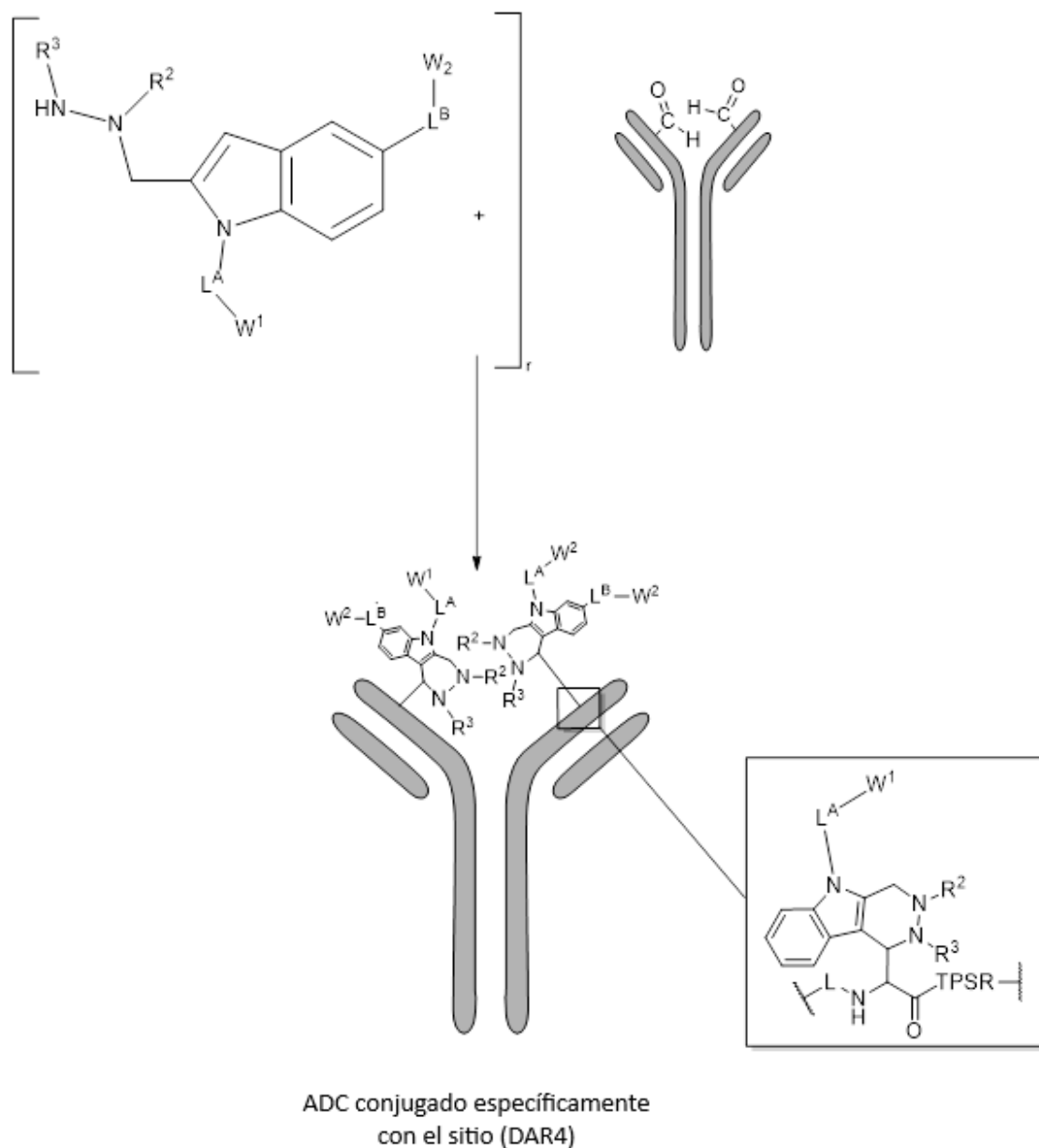


[0001] En el **esquema A**, el fármaco enlazador se conjuga con un anticuerpo contra TF. El anticuerpo contra TF tiene un motivo de reconocimiento, por ejemplo, un motivo de reconocimiento L(C/S)TPSR (SEQ ID NO:99) en cada una de las regiones constantes CH1 y el extremo C (CT) de la cadena pesada (*por ejemplo*, SEQ ID NO:80 o 86 como se describió anteriormente). El residuo de cisteína de un motivo de reconocimiento L(C/S)TPSR (SEQ ID NO:99) puede convertirse en una formilglicina (fGly) y posteriormente conjugarse con una fracción azaHIPS a través de una reacción de Pictet-Spengler.

Otro esquema ilustrativo para preparar un TF-ADC se muestra en el **Esquema B**:



ADC conjugado específicamente
con el sitio (DAR4)



En el **Esquema B**, el enlazador-fármaco se conjuga con un anticuerpo contra TF. El anticuerpo contra TF tiene un motivo de reconocimiento, por ejemplo, un motivo de reconocimiento LCTPSR (SEQ ID NO:100) en la región constante CH1 de la cadena pesada (*por ejemplo*, SEQ ID NO:77 o 83 como se describió anteriormente). El residuo de cisteína de un motivo de reconocimiento LCTPSR (SEQ ID NO:100) puede convertirse en una formilglicina (fGly) y, posteriormente, conjugarse con un restos azaHIP a través de una reacción de Pictet-Spengler.

En algunas modalidades, el TF-ADC tiene la Fórmula (II), s es 2, Ab comprende EXMA006, tal como se describe en la presente, y tal como se enumera en la **Tabla 3** a continuación, y los sitios de conjugación del resto de piridazina-pirroló con el anticuerpo se encuentran en la región CH1 de cada cadena pesada del anticuerpo, tal como se muestra en el **Esquema B**. En determinadas modalidades, el Ab comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de

aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:79 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:91. Por consiguiente, el ADC correspondiente también se denomina en la presente TF-ADC 6-4. Como lo entendería un experto en la materia, la relación fármaco-anticuerpo de TF-ADC 6-4 es 4. En modalidades adicionales, una composición que comprende TF-ADC 6-4 presenta una DAR de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, por ejemplo, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9 o aproximadamente 4,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 3,4.

Tabla 3.

Sitio(s) de conjug. de Ab	CH1	CH1/CT
EXMA006	TF-ADC 6-4	TF-ADC 6-8
EXMA007	TF-ADC 7-4	TF-ADC 7-8

En algunas modalidades, el TF-ADC tiene la Fórmula (II), s es 4, Ab comprende EXMA006, tal como se describe en la presente, y tal como se enumera en la **Tabla 3** anteriormente, y los sitios de conjugación del resto de piridazina-pirrolo con el anticuerpo son las regiones CH1 y CT de cada cadena pesada del anticuerpo, tal como se muestra en el **Esquema A**. En determinadas modalidades, el Ab comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:82 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:91. Por consiguiente, el ADC correspondiente también se denomina en la presente TF-ADC 6-8. Tal como podría entender un experto en la técnica, la relación de fármaco-anticuerpo del TF-ADC 6-8 es 8. En modalidades adicionales, una composición que comprende el TF-ADC 6-8 presenta una DAR de alrededor de 6 a alrededor de 8, por ejemplo, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, alrededor de 8,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 6,6. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 7,5.

En algunas modalidades, el TF-ADC tiene la Fórmula (II), s es 2, Ab comprende EXMA007, tal como se describe en la presente, y tal como se enumera en la **Tabla 3** anteriormente, y los sitios de conjugación del resto de piridazina-pirrolo con el anticuerpo se encuentran en la región CH1 de cada cadena pesada del anticuerpo, tal como se muestra en el **Esquema B**. En determinadas modalidades, el Ab comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:85 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:92. Por consiguiente, el ADC

correspondiente también se denomina en la presente TF-ADC 7-4. Tal como podría entender un experto en la técnica, la relación de fármaco-anticuerpo del TF-ADC 7-4 es 4. En modalidades adicionales, una composición que comprende el TF-ADC 7-4 presenta una DAR de alrededor de 3 a alrededor de 4, por ejemplo, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, o alrededor de 4,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 3,1. En algunas modalidades, el TF-ADC tiene la Fórmula (II), s es 4, Ab comprende EXMA007, tal como se describe en la presente, y tal como se enumera en la **Tabla 3** anteriormente, y los sitios de conjugación del resto de piridazina-pirrolo con el anticuerpo son las regiones CH1 y CT de cada cadena pesada del anticuerpo, tal como se muestra en el **Esquema A**. En determinadas modalidades, el Ab comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:88 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO:92. Por consiguiente, el ADC correspondiente también se denomina en la presente TF-ADC 7-8. Tal como podría entender un experto en la técnica, la relación de fármaco-anticuerpo del TF-ADC 7-8 es 8. En modalidades adicionales, una composición que comprende el TF-ADC 7-8 presenta una DAR de alrededor de 6 a alrededor de 8, por ejemplo, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, alrededor de 8,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 6,5. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 7,1.

En algunas modalidades, un TF-ADC incluye uno o más enlazadores-fármaco conjugados a cada región constante de cadena pesada de un anticuerpo contra TF a través de una fracción de acoplamiento de piridazina-pirrolo y puede caracterizarse por una relación estequiométrica de anticuerpo a enlazador-fármaco de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, por ejemplo, una DAR de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, aproximadamente 1 a aproximadamente 4, aproximadamente 2 a aproximadamente 4, aproximadamente 3 a aproximadamente 4, aproximadamente 4, aproximadamente 1 a aproximadamente 8, aproximadamente 2 a aproximadamente 8, aproximadamente 3 a aproximadamente 8, aproximadamente 4 a aproximadamente 8, aproximadamente 5 a aproximadamente 8, aproximadamente 6 a aproximadamente 8, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, aproximadamente 6 a aproximadamente 7, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, aproximadamente 7 a aproximadamente 8, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8.

MEDICAMENTOS PARA LA CONJUGACIÓN

Tal como se señaló anteriormente, un conjugado o un compuesto de la presente descripción

puede incluir como sustituyentes W^1 y W^2 un fármaco o agente activo. Existen varios fármacos que son adecuados para su uso, o pueden modificarse para que sean adecuados para su uso, como socio reactivo para conjugarse con un anticuerpo. Los ejemplos de medicamentos incluyen medicamentos de moléculas pequeñas y medicamentos peptídicos.

«Fármaco de molécula pequeña», tal como se usa en la presente, se refiere a un compuesto, por ejemplo, un compuesto orgánico, que presenta una actividad farmacéutica de interés y que generalmente tiene un peso molecular de 800 Da o menos, o 2000 Da o menos, pero puede abarcar moléculas de hasta 5 kDa y puede ser tan grande como 10 kDa. Una pequeña molécula inorgánica se refiere a una molécula que no contiene átomos de carbono, mientras que una pequeña molécula orgánica se refiere a un compuesto que contiene al menos un átomo de carbono.

Por ejemplo, el fármaco o agente activo puede ser un inhibidor de la topoisomerasa (*por ejemplo*, un inhibidor de la topoisomerasa I), tal como una camptotecina, o un análogo o derivado de la misma, o una fracción de camptotecina farmacéuticamente activa y/o una porción de la misma. Un inhibidor de la topoisomerasa (*por ejemplo*, camptotecina, o análogo o derivado de la misma) conjugado con el anticuerpo contra TF puede ser cualquiera de una variedad de inhibidores de la topoisomerasa, por ejemplo, camptotecina o fracciones de camptotecina tales como, pero no limitados a, camptotecina y análogos y derivados de la misma como se describe en este documento. Los ejemplos de fármacos que encuentran uso en los conjugados y compuestos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de la topoisomerasa, por ejemplo camptotecina o un derivado de camptotecina, tal como SN-38, Belotecan, Exatecan, 9-aminocamptotecina (9-AC), topotecan, *des*-Me-topotecan, derivados de los mismos y similares. Se describen ejemplos adicionales de inhibidores de la topoisomerasa que encuentran uso en la presente descripción en PCT/US2022/012325, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

En otras modalidades, el fármaco o agente activo puede ser una maitansina. «Maytansina», «fracción de maytansina», «fracción de agente activo de maytansina» y «maytansinoide» se refieren a una maitansina y análogos y derivados de la misma, y fracciones y/o porciones de maytansina farmacéuticamente activas de la misma. Una maitansina conjugada con el anticuerpo contra TF puede ser cualquiera de una variedad de fracciones de maitansinoide tales como, pero no limitado a, maitansina y análogos y derivados de la misma como se describe en este documento (*por ejemplo*, deacilmaitansina).

En otros casos, el fármaco o agente activo puede ser una auristatina, o un análogo o derivado de la misma, o una fracción de auristatina farmacéuticamente activa y/o una porción de la misma. Una auristatina conjugada con el anticuerpo contra TF puede ser cualquiera de una variedad de fracciones de auristatina tales como, pero no limitado a, una auristatina y análogos y derivados de la misma como se describe en este documento. Los ejemplos de fármacos que encuentran

uso en los conjugados y compuestos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, una auristatina o un derivado de auristatina, como monometil auristatina D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), derivados de las mismas y similares.

En otros casos, el fármaco o agente activo puede ser una duocarmicina, o un análogo o derivado de la misma, o una fracción de duocarmicina farmacéuticamente activa y/o una porción de la misma. Una duocarmicina conjugada con el anticuerpo contra TF puede ser cualquiera de una variedad de fracciones de duocarmicina tales como, pero no limitado a, una duocarmicina y análogos y derivados de la misma como se describe en este documento. Los ejemplos de fármacos que encuentran uso en los conjugados y compuestos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, una duocarmicina o un derivado de duocarmicina, como duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA y CC-1065, derivados de los mismos y similares. En algunas modalidades, la duocarmicina es un análogo de duocarmicina, tal como, entre otros, adozelesina, bizelesina o carzelesina.

En ciertas modalidades, el fármaco se selecciona entre una citotoxina, un inhibidor de quinasa, un modulador selectivo del receptor de estrógeno, un agente inmunoestimulante, un agonista del receptor tipo Toll (TLR), un oligonucleótido, un aptámero, una citocina, un esteroide y un péptido. Por ejemplo, una citotoxina puede incluir cualquier compuesto que conduzca a la muerte celular (*por ejemplo*, necrosis o apoptosis) o una disminución de la viabilidad celular.

Los inhibidores de quinasa pueden incluir, entre otros, Adavosertib, Afatinib, Axitinib, Bosutinib, Cetuximab, Cobimetinib, Crizotinib, Cabozantinib, Dacomitinib, Dasatinib, Entrectinib, Erdafitinib, Erlotinib, Fostamatinib, Gefitinib, Ibrutinib, Imatinib, Lapatinib, Lenvatinib, Mubritinib, Nilotinib, Pazopanib, Pegaptanib, Ruxolitinib, Sorafenib, Sunitinib, Tucatinib, Vandetanib, Vemurafenib y similares.

Por ejemplo, los moduladores selectivos del receptor de estrógeno incluyen, entre otros, endoxifeno, tamoxifeno, afimoxifeno, toremifeno y similares.

Los agentes inmunoestimulantes pueden incluir, pero no se limitan a, vacunas (*por ejemplo*, vacunas bacterianas o virales), factores estimulantes de colonias, interferones, interleucinas y similares. Los agonistas de TLR incluyen, entre otros, imiquimod, resiquimod y similares.

Los oligonucleótidos incluyen, entre otros, fomivirsén, pegaptanib, mipomersén, eteplirsén, defibrotide, nusinersén, golodirsén, viltolarsén, volanesorsén, inotersén, tofersén, tominersén y similares.

Los fármacos aptámeros incluyen, entre otros, pegaptanib, AS1411, REG1, ARC1779, NU172, ARC1905, E10030, NOX-A12, NOX-E36 y similares.

Las citocinas incluyen, entre otras, albinterferón alfa-2B, aldesleucina, ALT-801, anakinra, ancestim, avotermin, balugrastim, bempegaldesleucina, binetracina, cintredequina besudotox, CTCE-0214, darbepoetina alfa, denileucina diftotox, dulanermina, edodequina alfa, emfilermina,

epoetina delta, eritropoyetina, interleucina-2 humana, interferón alfa, interferón alfa-2c, interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón alfacon-1, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón gamma-1b, interferón kappa, interleucina-1 alfa, interleucina-10, interleucina-7, lenograstim, leridistim, Lipegfilgrastim, Lorukafusp alfa, Maxy-G34, Metoxi polietilenglicol-epoetina beta, Molgramostim, Muplestim, Nagrestipen, Oprelvekin, Pegfilgrastim, Pegilodecakin, Peginterferón alfa-2a, Peginterferón alfa-2b, Peginterferón beta-1a, Peginterferón lambda-1a, Ligando CD40 recombinante, Regramostim, Romiplostim, Sargramostim, Trombopoyetina, Tucotuzumab celmoleukin, Proteína inflamatoria de macrófagos virales y similares.

Los medicamentos esteroides incluyen, entre otros, prednisolona, betametasona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, deflazacort y similares.

El término «fármaco peptídico» tal como se utiliza en el presente documento se refiere a compuestos poliméricos que contienen aminoácidos y pretende abarcar péptidos, oligopéptidos, péptidos cíclicos, polipéptidos y proteínas de origen natural y no natural, así como miméticos de péptidos. Los fármacos peptídicos pueden obtenerse mediante síntesis química o producirse a partir de una fuente codificada genéticamente (*por ejemplo*, una fuente recombinante). Los fármacos peptídicos pueden variar en peso molecular y pueden tener un peso molecular de entre 200 Da y 10 kDa o más. Los péptidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, péptidos citotóxicos; péptidos angiogénicos; péptidos antiangiogénicos; péptidos que activan las células B; péptidos que activan las células T; péptidos antivirales; péptidos que inhiben la fusión viral; péptidos que aumentan la producción de una o más poblaciones de linfocitos; péptidos antimicrobianos; factores de crecimiento; factores liberadores de la hormona del crecimiento; péptidos vasoactivos; péptidos antiinflamatorios; péptidos que regulan el metabolismo de la glucosa; un péptido antitrombótico; un péptido antinociceptivo; un péptido vasodilatador; un inhibidor de la agregación plaquetaria; un analgésico; y similares.

Otros ejemplos de fármacos que se utilizan en los conjugados y compuestos descritos en este documento incluyen, entre otros, tubulisina M, caliqueamicina, un inhibidor de STAT3, alfa-amanitina, un inhibidor de la quinasa Aurora, belotecán y una antraciclina.

Otros ejemplos de fármacos incluyen fármacos de moléculas pequeñas, tales como un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, cuando una célula tumoral expresa o sobreexpresa TF, el anticuerpo contra TF se puede producir como se describe en este documento para incluir un aminoácido modificado, que se puede conjugar posteriormente con un agente quimioterapéutico contra el cáncer. Los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen compuestos no peptídicos (es decir, no proteicos) que reducen la proliferación de células cancerosas y abarcan agentes citotóxicos y agentes citoestáticos. Los ejemplos no taxativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides de plantas (vinca) y hormonas esteroides. También se pueden utilizar compuestos peptídicos.

Los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer adecuados incluyen dolastatina y análogos activos y derivados de esta y auristatina y análogos activos y derivados de esta (por ejemplo, monometil auristatina D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF) y similares). Véase, por ejemplo, WO 96/33212, WO 96/14856 y U.S. 6.323.315. Por ejemplo, la dolastatina 10 o la auristatina PE se pueden incluir en un conjugado anticuerpo-fármaco de la presente descripción. Los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer adecuados también incluyen maitansinoides y derivados y análogos activos de estos (véase, por ejemplo, EP 1391213; y Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623); duocarcinas y derivados y análogos activos de estas (por ejemplo, incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB 1-TM1); y benzodiazepinas y derivados y análogos activos de estas (por ejemplo, pirrolobenzodiazepina (PBD)).

Los agentes que actúan para reducir la proliferación celular son conocidos en la técnica y se utilizan ampliamente. Tales agentes incluyen agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos y triazenos, que incluyen, de modo no taxativo, mecloretamina, ciclofosfamida (CytosanTM), melfalan (L-sarcolisina), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU), estreptozocina, clorozotocina, mostaza de uracilo, clormetina, ifosfamida, clorambucilo, pipobromán, trietilenmelamina, trietilentiofosforamina, busulfán, dacarbazina y temozolomida.

Los agentes antimetabolito incluyen análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa, que incluyen, de modo no taxativo, citarabina (CYTOSAR-U), arabinósido de citosina, fluorouracilo (5-FU), floxuridina (FudR), 6-tioguanina, 6-mercaptopurina (6-MP), pentostatina, 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, 10-propargil-5,8-didesazafolato (PDDF, CB3717), ácido 5,8-didesazatetrahidrofólico (DDATHF), leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Los productos naturales adecuados y sus derivados, (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas), incluyen, de modo no taxativo, Ara-C, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina; brequinar; alcaloides, por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, y similares; podofilotoxinas, por ejemplo, etoposida, teniposida, y similares; antibióticos, por ejemplo, antraciclina, clorhidrato de daunorrubicina (daunomicina, rubidomicina, cerubidina), idarrubicina, doxorubicina, epirubicina y derivados de morfolino, y similares; fenoxizona bisciclopéptidos, por ejemplo, dactinomicina; glicopéptidos básicos, por ejemplo, bleomicina; glicósidos de antraquinona, por ejemplo, plicamicina (mitramicina); antracenediones, por ejemplo, mitoxantrona; azirinopirrol indolediones, por ejemplo, mitomicina; inmunosupresores macrocíclicos, por ejemplo, ciclosporina, FK-506 (tacrolimus, prograf), rapamicina, y similares; y similares.

Otros agentes citotóxicos anti-proliferativos son navelbeno, CPT-11, anastrozol, letrozol,

capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

Los agentes que afectan a los microtúbulos que tienen actividad antiproliferativa también son adecuados para su uso e incluyen, de modo no taxativo, alocolchicina (NSC 406042), halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados la colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolstatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (Taxol®), derivados de Taxol®, docetaxel (Taxotere®), tiocolchicina (NSC 361792), tritil cisterina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, epotilonas naturales y sintéticas que incluyen, de modo no taxativo, eotilona A, epotilona B, discodermolida; estramustina, nocodazol y similares.

Los moduladores hormonales y esteroides (incluidos los análogos sintéticos) que son adecuados para su uso incluyen, de modo no taxativo, adrenocorticosteroides, por ejemplo, prednisona, dexametasona y similares; estrógenos y pregestinas, por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, estradiol, clomifeno, tamoxifeno; y similares; supresores adrenocorticales, por ejemplo, aminoglutetimida; 17 α -etinilestradiol; dietilestilbestrol, testosterona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, Flutamida (Drogenil), Toremifeno (Fareston), y Zoladex®. Los estrógenos estimulan la proliferación y diferenciación, por lo tanto, los compuestos que se unen al receptor de estrógeno se utilizan para bloquear esta actividad. Los corticosteroides pueden inhibir la proliferación de linfocitos T.

Otros agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen complejos metálicos, *por ejemplo*, cisplatino (cis-DDP), carboplatino, etc.; ureas, *por ejemplo*, hidroxiiurea; e hidrazinas, *por ejemplo*, N-metilhidrazina; epidofilotoxina; un inhibidor de la topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; leucovorina; tegafur; etc. Otros agentes antiproliferativos de interés incluyen inmunosupresores, *por ejemplo*, ácido micofenólico, talidomida, desoxispergualina, azasporina, leflunomida, mizoribina, azaspirano (SKF 105685); Iressa® (ZD 1839, 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-metoxi-6-(3-(4-morfolinil)propoxi)quinazolina); etc.

Los taxanos son adecuados para su uso. Los «taxanos» incluyen paclitaxel, así como cualquier profármaco o derivado de taxano activo. «Paclitaxel» (que debe entenderse que incluye en la presente análogos, formulaciones y derivados, tales como, por ejemplo, docetaxel, TAXOL□, TAXOTERE™ (una formulación de docetaxel), análogos de 10-desacetil de paclitaxel y análogos de 3'N-desbenzoil-3'N-t-butoxicarbonilo de paclitaxel) puede prepararse fácilmente mediante técnicas conocidas por las personas del oficio de nivel medio (ver también WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076; las patentes estadounidenses n.º 5.294.637; 5.283.253; 5.279.949; 5.274.137; 5.202.448; 5.200.534; 5.229.529; y EP 590.267) o puede obtenerse a través de diversas fuentes comerciales, incluso,

por ejemplo, Sigma Chemical Co., San Luis, Mo. (T7402 de *Taxus brevifolia*; o T-1912 de *Taxus yannanensis*).

Debe entenderse que paclitaxel se refiere no solo a la forma químicamente disponible común de paclitaxel, sino también a análogos y derivados (por ejemplo, Taxotere[®] docetaxel, tal como se indicó anteriormente) y conjugados de paclitaxel (por ejemplo, paclitaxel-PEG, paclitaxel-dextrano o paclitaxel-xilosa).

También se incluyen dentro del término «taxano» una variedad de derivados conocidos, incluidos tanto derivados hidrófilos como derivados hidrófobos. Los derivados de taxano incluyen, de modo no taxativo, los derivados de galactosa y manosa descritos en la solicitud de patente internacional n.º WO 99/18113; piperazino y otros derivados descritos en WO 99/14209; los derivados de taxano descritos en WO 99/09021, WO 98/22451 y la patente estadounidense n.º 5.869.680; los derivados de 6-tio descritos en WO 98/28288; los derivados de sulfenamida descritos en la patente estadounidense n.º 5.821.263; y el derivado de taxol descrito en la patente estadounidense n.º 5.415.869. Incluye además profármacos de paclitaxel que incluyen, entre otros, los descritos en WO 98/58927; WO 98/13059; y la patente de EE. UU. N.º 5.824.701.

Los modificadores de la respuesta biológica adecuados para su uso incluyen, entre otros, (1) inhibidores de la actividad de la tirosina quinasa (RTK); (2) inhibidores de la actividad de la serina/treonina quinasa; (3) antagonistas de antígenos asociados a tumores, como anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno tumoral; (4) agonistas del receptor de apoptosis; (5) interleucina-2; (6) IFN- α ; (7) IFN- γ ; (8) factores estimulantes de colonias; y (9) inhibidores de la angiogénesis.

Los ejemplos de fármacos incluyen fármacos de moléculas pequeñas, tales como un agente quimioterapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, cuando una célula tumoral expresa o sobreexpresa el TF, el anticuerpo contra TF puede producirse tal como se describe en la presente para que incluya un aminoácido modificado, que puede conjugarse posteriormente con un agente quimioterapéutico contra el cáncer, tal como un agente que afecta los microtúbulos. En determinadas modalidades, el fármaco es un agente que afecta los microtúbulos que tiene actividad antiproliferativa, tal como un maitansinoide.

Las modalidades de la presente descripción incluyen conjugados en los que un anticuerpo está conjugado con dos o más fracciones de fármaco, tales como 3 fracciones de fármaco, 4 fracciones de fármaco, 5 fracciones de fármaco, 6 fracciones de fármaco, 7 fracciones de fármaco, 8 fracciones de fármaco, 9 fracciones de fármaco, 10 fracciones de fármaco, 11 fracciones de fármaco, 12 fracciones de fármaco, 13 fracciones de fármaco, 14 fracciones de fármaco, 15 fracciones de fármaco, 16 fracciones de fármaco, 17 fracciones de fármaco, 18 fracciones de fármaco, 19 fracciones de fármaco o 20 o más fracciones de fármaco. Las fracciones del fármaco se pueden conjugar con el anticuerpo en uno o más sitios del anticuerpo, como se describe en este documento. En ciertas modalidades, los conjugados tienen una

relación fármaco-anticuerpo (DAR) promedio (relación molar) en el intervalo de 0,1 a 20, o de 0,5 a 20, o de 1 a 20, tal como de 1 a 19, o de 1 a 18, o de 1 a 17, o de 1 a 16, o de 1 a 15, o de 1 a 14, o de 1 a 13, o de 1 a 12, o de 1 a 11, o de 1 a 10, o de 1 a 9, o de 1 a 8, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2. En ciertas modalidades, los conjugados tienen una DAR promedio de 1 a 10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En ciertas modalidades, los conjugados tienen una DAR promedio de 1 a 10. En determinadas modalidades, los conjugados tienen una DAR promedio de 1 a 5 (por ejemplo, 4). En determinadas modalidades, los conjugados tienen una DAR promedio de 5 a 10 (por ejemplo, 8). Por promedio se entiende la media aritmética.

En ciertas modalidades, los dos fármacos o agentes activos unidos al conector ramificado son el mismo fármaco o agente activo. Por ejemplo, una primera rama de un enlazador ramificado puede estar unida a un fármaco o un agente activo y una segunda rama del enlazador ramificado puede estar unida al mismo fármaco o al mismo agente activo que la primera rama. En otras modalidades, los dos fármacos o agentes activos unidos al conector ramificado son fármacos o agentes activos diferentes. Por ejemplo, una primera rama de un enlazador ramificado puede estar unida a un primer fármaco o un primer agente activo y una segunda rama del enlazador ramificado puede estar unida a un segundo fármaco o un segundo agente activo diferente del primer fármaco o el primer agente activo unido a la primera rama.

En algunas modalidades, donde dos fármacos o agentes activos diferentes están unidos al enlazador ramificado, los fármacos o agentes activos pueden seleccionarse de fármacos y agentes activos que tienen un efecto terapéutico sinérgico. Por ejemplo, en algunos casos, el uso de dos fármacos o agentes activos diferentes unidos al enlazador ramificado puede proporcionar una concentración terapéuticamente eficaz más baja en la que actúan ambas cargas activas, aumentando de ese modo la potencia general del ADC.

En algunas modalidades, donde dos fármacos o agentes activos diferentes están unidos al conector ramificado, los fármacos o agentes activos pueden seleccionarse entre fármacos y agentes activos que proporcionan un beneficio terapéutico mejorado en comparación con el uso de los fármacos o agentes activos por separado. Por ejemplo, los fármacos o agentes activos pueden proporcionar un mayor efecto en la administración del fármaco del ADC (*por ejemplo*, algunas cargas activas, como el péptido iRGD, pueden aumentar la extravasación en los tejidos y aumentar la penetración en el tumor).

En algunas modalidades, donde dos fármacos o agentes activos diferentes están unidos al enlazador ramificado, los fármacos o agentes activos pueden seleccionarse de fármacos y agentes activos que usan mecanismos de acción diferentes. En algunos casos, esto puede generar una disminución en la resistencia a los fármacos contra los tumores al dirigirse a múltiples vías. Los ejemplos de combinaciones de carga activa pueden incluir, de modo no taxativo, fármacos citotóxicos, moléculas inmunomoduladoras para activar o inhibir poblaciones

de células inmunitarias, citocinas, hormonas, agentes quelantes cargados con radioisótopos, y similares.

En algunas modalidades, donde dos fármacos o agentes activos diferentes están unidos al conector ramificado, los dos fármacos o agentes activos diferentes son un inhibidor de la topoisomerasa (*por ejemplo*, belotecan) como se describe en este documento y una auristatina (*por ejemplo*, MMAE) como se describe en este documento. En algunas modalidades, cuando dos fármacos o agentes activos diferentes se unen al enlazador ramificado, los dos fármacos o agentes activos diferentes son un inhibidor de la topoisomerasa (*por ejemplo*, belotecán), tal como se describe en la presente, y un péptido iRGD, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, cuando dos fármacos o agentes activos diferentes se unen al enlazador ramificado, los dos fármacos o agentes activos diferentes son una auristatina (*por ejemplo*, MMAE), tal como se describe en la presente, y un péptido iRGD, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, cuando dos fármacos o agentes activos diferentes se unen al enlazador ramificado, los dos fármacos o agentes activos diferentes son una auristatina (*por ejemplo*, MMAE), tal como se describe en la presente, y un inhibidor de cinasa (*por ejemplo*, Sorafenib, Lapatinib, Gefitinib, y similares), tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, cuando dos fármacos o agentes activos diferentes se unen al enlazador ramificado, los dos fármacos o agentes activos diferentes son un inhibidor de la topoisomerasa (*por ejemplo*, belotecán), tal como se describe en la presente, y un inhibidor de cinasa (*por ejemplo*, Sorafenib, Lapatinib, Gefitinib, y similares), tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, cuando dos fármacos o agentes activos diferentes se unen al enlazador ramificado, los dos fármacos o agentes activos diferentes son una auristatina (*por ejemplo*, MMAE), tal como se describe en la presente, y un modulador del receptor de estrógeno selectivo (*por ejemplo*, Endoxifen), tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, cuando dos fármacos o agentes activos diferentes se unen al enlazador ramificado, los dos fármacos o agentes activos diferentes son un inhibidor de la topoisomerasa (*por ejemplo*, belotecán), tal como se describe en la presente, y un modulador del receptor de estrógeno selectivo (*por ejemplo*, Endoxifen), tal como se describe en la presente.

Los medicamentos que se conjugarán con un anticuerpo contra TF pueden modificarse para incorporar un socio reactivo para la reacción con el anticuerpo contra TF. Cuando el fármaco es un fármaco polipeptídico, el resto reactivo (*por ejemplo*, aminooxi o hidrazida) se puede colocar en una región del extremo N, el extremo N, una región del extremo C, el extremo C, o en una posición interna al péptido. Por ejemplo, un ejemplo de un método implica sintetizar un fármaco peptídico que tiene un grupo aminooxi. En este ejemplo, el péptido se sintetiza a partir de un precursor protegido con Boc. Un grupo amino de un péptido puede reaccionar con un compuesto que comprende un grupo de ácido carboxílico y un grupo oxi-N-Boc. Como ejemplo, el grupo amino del péptido reacciona con el ácido 3-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)propanoico. Otras

variaciones del compuesto que comprende un grupo de ácido carboxílico y un grupo protector de oxi-N pueden incluir diferentes números de carbonos en el enlace de alquileo y sustituyentes en el enlace de alquileo. La reacción entre el grupo amino del péptido y el compuesto que comprende un grupo ácido carboxílico y un grupo protector de oxi-N se produce a través de la química de acoplamiento de péptidos estándar. Los ejemplos de reactivos de acoplamiento de péptidos que se pueden utilizar incluyen, entre otros, DCC (diciclohexilcarbodiimida), DIC (diisopropilcarbodiimida), di-p-toluoilcarbodiimida, BDP (dietilfosfato de 1-benzotriazol-1-ciclohexil-3-(2-morfoliniletil)carbodiimida), EDC (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil-3-etilcarbodiimida), fluoruro cianúrico, cloruro cianúrico, TFFH (hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio), DPPA (difenilfosforazidato), BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio), HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio), TBTU (Tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio), TSTU (tetrafluoroborato de O-(N-succinimidilo)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), HATU (N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(dimetilamino)-1-H-1,2,3-triazolo[4,5,6]-piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio), BOP-Cl (cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico), PyBOP (tetrafluorofosfato de (1-H-1,2,3-benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfonio), BrOP (hexafluorofosfato de bromotris(dimetilamino)fosfonio), DEPBT (3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona) PyBrOP (hexafluorofosfato de bromotris(pirrolidino)fosfonio). Como ejemplo no limitativo, HOBt y DIC pueden utilizarse como reactivos de acoplamiento de péptidos. La desprotección para exponer la funcionalidad amino-oxi se realiza en el péptido que comprende un grupo N-protector. La desprotección del grupo N-oxisuccinimida, por ejemplo, ocurre de acuerdo con las condiciones de desprotección estándar para un grupo amida cíclico. Las condiciones de desprotección se pueden encontrar en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3.^a Ed., 1999, John Wiley & Sons, NY y Harrison et al. Determinadas condiciones de desprotección incluyen un reactivo de hidrazina, reactivo de amino o borohidrido sódico. La desprotección de un grupo protector Boc puede ocurrir con TFA. Otros reactivos para la desprotección incluyen, entre otros, hidrazina, metilhidrazina, fenilhidrazina, borohidruro de sodio y metilamina. El producto y los intermedios se pueden purificar por medios convencionales, como la purificación por HPLC.

El técnico con experiencia ordinaria apreciará que factores como el pH y el impedimento estérico (*es decir*, la accesibilidad del residuo de aminoácido a la reacción con un compañero reactivo de interés) son importantes. La modificación de las condiciones de reacción para proporcionar condiciones de conjugación óptimas está dentro de la experiencia del técnico con experiencia ordinaria y es una rutina en la técnica. Cuando la conjugación se lleva a cabo con un anticuerpo contra TF presente en o sobre una célula viva, las condiciones se seleccionan de modo que sean fisiológicamente compatibles. Por ejemplo, el pH se puede reducir temporalmente durante un tiempo suficiente para permitir que se produzca la reacción, pero dentro de un período tolerado

por la célula (*por ejemplo*, de aproximadamente 30 minutos a 1 hora). Las condiciones fisiológicas para llevar a cabo la modificación de anticuerpos en una superficie celular pueden ser similares a las utilizadas en una reacción de cetona-azida en la modificación de células que portan azidas en la superficie celular (véase, *por ejemplo*, U.S. 6.570.040).

Los compuestos de moléculas pequeñas que contienen, o están modificados para contener, un grupo nucleofílico α que actúa como un socio reactivo con un compuesto o conjugado divulgado en este documento también se contemplan para su uso como fármacos en los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente descripción. En la técnica se conocen métodos generales para esquemas y condiciones de síntesis química útiles para sintetizar un compuesto de interés (véase, *por ejemplo*, Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, quinta edición, Wiley-Interscience, 2001; o Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, cuarta edición, Nueva York: Longman, 1978).

FORMULACIONES Y COMPOSICIONES

Los TF-ADC se pueden incluir en una composición farmacéutica para su administración, *por ejemplo*, a un sujeto para tratar una enfermedad, trastorno o afección. Una composición farmacéutica puede comprender TF-ADC que, en promedio, pueden exhibir una relación fármaco-anticuerpo («DAR») de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20, o de 0,5 a 20, o de 1 a 20. En otras palabras, cada anticuerpo está conjugado con uno o dos conjugados de fármaco-enlazador. Los métodos para determinar DAR son bien conocidos por los expertos e incluyen métodos que utilizan cromatografía de fase inversa o HPLC-MS.

Por ejemplo, en cualquier realización, una composición farmacéutica que comprende un TF-ADC puede exhibir una DAR de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20, o de 0,5 a 20, o de 1 a 20, tal como de 1 a 19, o de 1 a 18, o de 1 a 17, o de 1 a 16, o de 1 a 15, o de 1 a 14, o de 1 a 13, o de 1 a 12, o de 1 a 11, o de 1 a 10, o de 1 a 9, o de 1 a 8, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 20, o de 2 a 19, o de 2 a 18, o de 2 a 17, o de 2 a 16, o de 2 a 15, o de 2 a 14, o de 2 a 13, o de 2 a 12, o de 2 a 11, o de 2 a 10, o de 2 a 9, o de 2 a 8, o de 2 a 7, o de 2 a 6, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 20, o de 3 a 19, o de 3 a 18, o de 3 a 17, o de 3 a 16, o de 3 a 15, o de 3 a 14, o de 3 a 13, o de 3 a 12, o de 3 a 11, o de 3 a 10, o de 3 a 9, o de 3 a 8, o de 3 a 7, o de 3 a 6, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 20, o de 4 a 19, o de 4 a 18, o de 4 a 17, o de 4 a 16, o de 4 a 15, o de 4 a 14, o de 4 a 13, o de 4 a 12, o de 4 a 11, o de 4 a 10, o de 4 a 9, o de 4 a 8, o de 4 a 7, o de 4 a 6, o de 4 a 5, o de 5 a 20, o de 5 a 19, o de 5 a 18, o de 5 a 17, o de 5 a 16, o de 5 a 15, o de 5 a 14, o de 5 a 13, o de 5 a 12, o de 5 a 11, o de 5 a 10, o de 5 a 9, o de 5 a 8, o de 5 a 7, o de 5 a 6, o de 6 a 20, o de 6 a 19, o de 6 a 18, o de 6 a 17, o de 6 a 16, o de 6 a 15, o de 6 a 14, o de 6 a 13, o de 6 a 12, o de 6 a 11, o de 6 a 10, o de 6 a 9, o de 6 a 8, o de 6 a 7, o de 7 a 20, o de 7 a 19, o de 7 a 18, o de 7 a 17, o de 7 a 16, o de 7 a 15, o de 7 a 14, o de 7 a 13, o de 7 a 12, o de 7 a 11, o de 7 a 10, o de

7 a 9, o de 7 a 8. En ciertas modalidades, la composición presenta una DAR de 1 a 10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En ciertas modalidades, la composición presenta una DAR de 1 a 10. En determinadas modalidades, la composición presenta una DAR de 1 a 5 (por ejemplo, 3, 3,5 o 4). En ciertas modalidades, la composición presenta una DAR de 5 a 10 (*por ejemplo*, 6, o 6,5, o 7, o 7,5 u 8). En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF como se describe en este documento, incluyendo EXMA006 o EXMA007 (*véanse, por ejemplo, las Tablas 1-2*), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende TF-ADC 6-4. En modalidades adicionales, la composición que comprende el TF-ADC 6-4 presenta una DAR de alrededor de 3 a alrededor de 4, por ejemplo, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, o alrededor de 4,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 3,4.

En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende TF-ADC 7-4. En modalidades adicionales, la composición que comprende el TF-ADC 7-4 presenta una DAR de alrededor de 3 a alrededor de 4, por ejemplo, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5, alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8, alrededor de 3,9, o alrededor de 4,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 3,1.

En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende TF-ADC 6-8. En modalidades adicionales, la composición que comprende el TF-ADC 6-8 presenta una DAR de alrededor de 6 a alrededor de 8, por ejemplo, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, alrededor de 8,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 6,6. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 7,5.

En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende TF-ADC 7-8. En modalidades adicionales, la composición que comprende el TF-ADC 7-8 presenta una DAR de alrededor de 6 a alrededor de 8, por ejemplo, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, alrededor de 8,0. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 6,5. En algunas modalidades, la DAR de la composición es de alrededor de 7,1.

Un TF-ADC se puede formular de diversas maneras diferentes. Un TF-ADC de la presente

descripción se puede proporcionar en cualquier forma adecuada, *por ejemplo*, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y se puede formular para cualquier vía de administración adecuada, *por ejemplo*, administración oral, tópica o parenteral. Cuando un TF-ADC se proporciona como un líquido inyectable (como en aquellas modalidades en las que se puede administrar por vía intravenosa o directamente en un tejido), un TF-ADC se puede proporcionar como una forma de dosificación lista para usar, o como un polvo estable al almacenamiento para reconstitución o un líquido compuesto de excipientes y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los métodos para formular un TF-ADC pueden adaptarse a partir de los disponibles en la técnica. Por ejemplo, los TF-ADC pueden proporcionarse en una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un TF-ADC y un excipiente farmacéuticamente aceptable (*por ejemplo*, solución salina). La composición farmacéutica puede incluir opcionalmente otros aditivos (*por ejemplo*, tampones, estabilizadores, conservantes y similares). En algunas modalidades, las formulaciones son adecuadas para la administración a un mamífero, como aquellas que son adecuadas para la administración a un ser humano.

También se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz de un TF-ADC descrito en este documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF como se describe en este documento, incluidos EXMA006 y/o EXMA007, como se describe en cualquiera de **las Tablas 1-2**. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-8, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-8, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, una composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de un TF-ADC de Fórmula (I) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, diluyentes, otros excipientes o sustancias encapsulantes que sean adecuados para la administración a un sujeto humano o veterinario (*por ejemplo*, un sujeto fisiológicamente aceptable y/o farmacológicamente aceptable). El excipiente farmacéuticamente aceptable se puede mezclar con uno o más de los componentes activos, *por ejemplo*, una molécula híbrida, y entre sí, cuando hay más de un excipiente farmacéuticamente aceptable presente en la composición farmacéutica, de manera tal que no afecte sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. Los materiales farmacéuticamente aceptables normalmente pueden administrarse a un sujeto sin producir efectos fisiológicos indeseables significativos, como náuseas, mareos, sarpullido o malestar gástrico. Es deseable, por ejemplo, que una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable no sea inmunogénica cuando se administra a un sujeto humano con fines terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener adicionalmente agentes tampón adecuados, incluyendo, por ejemplo, ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente conservantes adecuados, como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden presentarse en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, muchos de los cuales son bien conocidos en la técnica de la farmacia. Dichos métodos incluyen el paso de poner el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención en asociación con un excipiente que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, la composición farmacéutica se prepara asociando de manera uniforme e íntima el agente activo con un excipiente líquido, un excipiente sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Una composición adecuada para administración parenteral comprende convenientemente una preparación acuosa estéril de la composición, que preferentemente es isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa se puede formular mediante métodos conocidos utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. Una preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos y estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo suave, como los mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos como el ácido oleico en la preparación de inyectables. Las formulaciones de excipientes adecuadas para administraciones orales, subcutáneas, intravenosas, intramusculares y similares se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

La preparación de composiciones farmacéuticas de la invención y sus diversas vías de administración se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Los sistemas de administración útiles en el contexto de la invención incluyen sistemas de administración de liberación prolongada, liberación retardada y liberación sostenida, de manera que la administración de la composición se produce antes y con tiempo suficiente para provocar la sensibilización del sitio a tratar. La composición se puede utilizar junto con otros agentes terapéuticos o terapias. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición, aumentando así la comodidad para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para algunas composiciones de la invención.

Existen muchos tipos de sistemas de liberación disponibles y conocidos por aquellos con conocimientos ordinarios en la materia. Los sistemas de liberación adecuados incluyen sistemas

de base polimérica tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxiбутírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos tales como esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; tabletas comprimidas que utilizan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, de modo no taxativo: (a) sistemas de erosión en donde la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz como las descritas en las patentes estadounidenses 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034, y 5.239.660 y (b) sistemas de difusión en el que un componente activo penetra a una velocidad controlada a partir de un polímero tal como se describe en las patentes estadounidenses 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden utilizar sistemas de administración de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

Generalmente, un TF-ADC o una composición farmacéutica se envasa adecuadamente, *por ejemplo*, en un vial, bolsa, ampolla y/o cualquier recipiente apropiado para un método terapéutico. Los componentes pueden proporcionarse como concentrados (incluidas composiciones liofilizadas), que pueden diluirse aún más antes de su uso, o pueden proporcionarse en la concentración de uso. Para el uso de un TF-ADC *in vivo*, se pueden proporcionar dosis únicas en recipientes esterilizados que tengan la cantidad y concentración deseadas de componentes.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

También se proporcionan en este documento métodos para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o afección mediada por TF, incluidos uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección mediada por TF con un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF, tal como anti-TF humano, y un fármaco conjugado directa o indirectamente al mismo. También se proporcionan en este documento métodos para matar células tumorales con un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF, tal como TF humano, y un fármaco conjugado directa o indirectamente con este.

El anticuerpo que se une a TF puede incluir cualquiera de los descritos en este documento, como EXMA006 y/o EXMA007, como se describe en cualquiera de **las Tablas 1-2**. En algunas modalidades, un método para matar una célula tumoral comprende poner en contacto la célula tumoral con un TF-ADC de Fórmula (I). En algunas modalidades, un método para matar una célula tumoral comprende poner en contacto la célula tumoral con un TF-ADC que comprende un análogo de camptotecina (*por ejemplo*, belotecan), o cualquier derivado del mismo. En algunas modalidades, un método para destruir una célula tumoral comprende la célula tumoral con un TF-ADC con la Fórmula (I) o (II). En algunas modalidades, un método para matar una

célula tumoral comprende poner en contacto la célula tumoral con un TF-ADC de TF-ADC-6-4, TF-ADC-7-4, TF-ADC-6-8 o TF-ADC-7-8. En algunas modalidades, el contacto se realiza *in vivo* o *in vitro*.

En cualquier realización, el método de poner en contacto la célula tumoral con un TF-ADC puede comprender poner en contacto la célula tumoral con una composición que comprende el TF-ADC y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, el TF-ADC en la composición puede caracterizarse por una DAR de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

También se proporciona en este documento un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz de un TF-ADC al sujeto, en donde el TF-ADC comprende un anticuerpo contra TF y un fármaco conjugado al mismo a través de un conector, como se describe en este documento. En algunas modalidades, el anticuerpo contra TF es EXMA006 o EXMA007, como se describe en este documento, como en cualquiera de **las Tablas 1-2**. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-8, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-8, tal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un TF-ADC de Fórmula (I) o (II).

En cualquier realización, el método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita puede comprender administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende el TF-ADC y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el TF-ADC en la composición farmacéutica puede caracterizarse por una DAR de alrededor de 1 a alrededor de 20, de alrededor de 1 a alrededor de 10, de alrededor de 2 a alrededor de 4, de alrededor de 3 a alrededor de 4, de alrededor de 5 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 7, o de alrededor de 7 a alrededor de 8.

En algunas modalidades, el método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita es eficaz para mejorar la eliminación de las células cancerosas, por ejemplo, células tumorales, en el sujeto.

Para «mejorar» la eliminación de células cancerosas o tumorales no es necesario aumentar la eliminación en un 100 %. Se contempla cualquier mejora en la tasa de eliminación. De manera similar, «modular» el crecimiento del tumor se refiere a reducir el tamaño del tumor, retardar su crecimiento o inhibir el aumento del tamaño de un tumor existente. No se requiere la abolición

completa de un tumor; cualquier disminución en el tamaño del tumor o desaceleración del crecimiento del tumor constituye un efecto biológico beneficioso en un sujeto. A este respecto, la eliminación de células tumorales se puede mejorar, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10% o al menos aproximadamente un 20% en comparación con los niveles de eliminación observados en ausencia del método (*por ejemplo*, en un sujeto o espécimen de control biológicamente coincidente que no está expuesto al agente del método). El efecto se detecta, por ejemplo, mediante una reducción del tamaño del tumor, una disminución o mantenimiento de los niveles de marcadores tumorales o una reducción o mantenimiento de una población de células tumorales. En algunas modalidades, la eliminación de células tumorales se mejora, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90% o más (aproximadamente un 100%) en comparación con la eliminación de células tumorales en ausencia de un agente de unión a TF (*por ejemplo*, un anticuerpo) del método.

La presente descripción también proporciona un método para modular (*por ejemplo*, inhibir, reducir, prevenir) el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF y un fármaco unido al mismo a través de un conector, como se describe en este documento, en una cantidad eficaz para modular el crecimiento tumoral en el sujeto. En algunas modalidades, un método para modular el crecimiento de un tumor en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad eficaz de un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF y un fármaco conjugado con este a través de un conector, como se describe en este documento. En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF es EXMA006 o EXMA007, tal como se describe en cualquiera de las **Tablas 1-2**. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-8, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-8, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, un método para modular el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesita comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un TF-ADC con la Fórmula (I) o (II).

En cualquier modalidad, el método para modular el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesita puede comprender administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende el TF-ADC y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, el TF-ADC en la composición farmacéutica puede caracterizarse por una DAR de alrededor de 1 a alrededor de 20, de alrededor de 1 a alrededor de 10, de alrededor de 2 a alrededor de 4, de alrededor de 3 a alrededor de 4, de alrededor de 5 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor

de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 7, o de alrededor de 7 a alrededor de 8.

En algunas modalidades, las células cancerosas y tumorales descritas en este documento que pueden tratarse y/o eliminarse mediante los métodos descritos en este documento expresan TF, por ejemplo, como en una superficie de la célula cancerosa o tumoral. En algunas modalidades, un tumor o una célula cancerosa puede sobreexpresar TF. Tal como se utiliza en este documento, el término «sobreexpresar» significa transcribir y traducir más producto genético de lo normal (como en las células normales), cuyo proceso suele ser una característica de las células cancerosas.

Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse con un TF-ADC descrito en la presente incluyen, de modo no taxativo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de mama triple negativo con receptores de estrógeno negativos (ER-), receptores de progesterona negativos (PR-) y HER2 negativo (HER2-), glioblastoma, cáncer, cáncer de vejiga, melanoma y cáncer de riñón.

Además, un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF se puede utilizar para aliviar o reducir los efectos secundarios asociados con el cáncer, como, por ejemplo, deterioro óseo, colapso vertebral y parálisis. En una realización, el sujeto sufre o está en riesgo de sufrir metástasis óseas y se administra un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF en una cantidad para reducir el deterioro del hueso circundante. En consecuencia, en algunas modalidades, un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF previene el deterioro óseo debido a metástasis óseas, en donde la proliferación de células tumorales se reduce o no. En algunas modalidades, un agente de unión a TF (*por ejemplo*, un anticuerpo o ADC), un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF, previene el deterioro óseo debido a metástasis óseas y reduce la proliferación de células tumorales. En general, el efecto sobre la proliferación de células tumorales (*por ejemplo*, inhibición de la proliferación o ningún efecto sobre la proliferación) depende del microambiente de una metástasis particular. Por ejemplo, se puede inhibir la proliferación de metástasis localizadas en microambientes con cantidades sustanciales de colágeno tipo 1. Por el contrario, no se puede inhibir la proliferación de metástasis localizadas en microambientes que carecen de cantidades sustanciales de colágeno tipo 1, pero se reduce o previene el deterioro óseo cerca de la metástasis.

Por lo tanto, la presente descripción también proporciona un método para aliviar o reducir los efectos secundarios asociados con el cáncer que comprende administrar una cantidad efectiva de un TF-ADC a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, un método para aliviar o reducir los efectos secundarios asociados con el cáncer comprende administrar una cantidad efectiva de un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF y un fármaco conjugado al mismo a través de un conector, como se describe en este documento. En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a TF es EXMA006 o EXMA007, tal como se describe en cualquiera de las

Tablas 1-2. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 6-8, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-4, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el TF-ADC es TF-ADC 7-8, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, un método para aliviar o reducir los efectos secundarios asociados con el cáncer comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un TF-ADC de Fórmula (I) o (II).

En cualquier realización, el método para aliviar o reducir los efectos secundarios asociados con el cáncer en un sujeto que lo necesita puede comprender administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un TF-ADC como se describe en este documento y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, el TF-ADC en la composición farmacéutica puede caracterizarse por una DAR de alrededor de 1 a alrededor de 20, de alrededor de 1 a alrededor de 10, de alrededor de 2 a alrededor de 4, de alrededor de 3 a alrededor de 4, de alrededor de 5 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 8, de alrededor de 6 a alrededor de 7, o de alrededor de 7 a alrededor de 8.

Además, un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF se puede utilizar para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, trastorno o afección mediada por TF, incluidos uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección mediada por TF con un TF-ADC que comprende un anticuerpo contra TF. En algunas modalidades, la enfermedad o afección implica neovascularización. En algunas modalidades, la enfermedad o afección que implica neovascularización es degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética o cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad o afección implica una inflamación vascular.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para detectar TF en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o condición, comprendiendo el método: (a) administrar al sujeto cualquiera de los anticuerpos anteriores; y (b) detectar la presencia o el nivel de TF en el sujeto.

En algunas modalidades, la enfermedad o afección es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de ovarios. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gástrico. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de esófago. En algunas modalidades, un cáncer es cáncer de cuello uterino. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de páncreas. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de mama triple negativo con receptores de estrógeno negativos (ER-), receptores de progesterona negativos (PR-) y HER2 negativo (HER2-). En algunas modalidades, el cáncer es glioblastoma. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer pulmonar. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de vejiga. En algunas modalidades, el cáncer es melanoma. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de

riñón.

En algunas modalidades, la enfermedad o afección implica neovascularización. En algunas modalidades, la enfermedad o afección que implica neovascularización es degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética o cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad o afección implica una inflamación vascular.

Se entiende que las modificaciones que no afectan sustancialmente la actividad de las diversas modalidades descritas en este documento también se proporcionan dentro de la definición de la materia aquí descrita. En consecuencia, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la presente descripción.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de proporcionar a los expertos en la materia una descripción y descripción completa de cómo realizar y utilizar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados Celsius y la presión es igual o cercana a la atmosférica. Por «promedio» se entiende la media aritmética. Se pueden utilizar abreviaturas estándar, por ejemplo, pb, pares de bases; kb, kilobase/s; pl, picolitros; s o seg, segundos; min, minutos; h o hr, hora/s; aa, aminoácidos; kb, kilobases; pb, pares de bases; nt, nucleótidos; i.m., intramuscular o intramuscularmente; i.p., intraperitoneal o intraperitonealmente; s.c, subcutánea o subcutáneamente; y similares.

Procedimientos sintéticos generales

Muchas referencias generales que proporcionan esquemas sintéticos químicos comúnmente conocidos y condiciones útiles para la síntesis de los compuestos descritos están disponibles (véase, por ejemplo, Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, quinta edición, Wiley-Interscience, 2001; o Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, cuarta edición, Nueva York: Longman, 1978).

Los compuestos como se describen en este documento se pueden purificar mediante cualquier protocolo de purificación conocido en la técnica, incluida la cromatografía, como HPLC, cromatografía de capa fina preparativa, cromatografía en columna flash y cromatografía de intercambio iónico. Se puede utilizar cualquier fase estacionaria adecuada, incluidas las fases normales e inversas, así como las resinas iónicas. En ciertas modalidades, los compuestos descritos se purifican mediante cromatografía de gel de sílice y/o alúmina. Véase, por ejemplo, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2.^a edición, ed. L. R. Snyder y J. J. Kirkland, John

Wiley and Sons, 1979; y Thin Layer Chromatography, ed E. Stahl, Springer-Verlag, Nueva York, 1969.

Durante cualquiera de los procesos de preparación de los compuestos en cuestión, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas en cuestión. Esto se puede lograr por medio de grupos protectores convencionales, tal como se describe en trabajos estándar, como J.F.W. McOmie, «Protective Groups in Organic Chemistry», Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, «Protective Groups in Organic Synthesis», tercera edición, Wiley, Nueva York 1999, en «The Peptides»; Volumen 3 (editores: E. Gross y J. Meienhofer), Academic Press, Londres y Nueva York 1981, en «Methoden der organischen Chemie», Houben-Weyl, 4.^a edición, Vol. 15/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, en H.-D. Jakubke y H. Jescheit, «Aminosäuren, Peptide, Proteine», Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach y Basel 1982, y/o en Jochen Lehmann, «Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate», Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Los grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior conveniente utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los compuestos en cuestión pueden sintetizarse a través de una variedad de rutas sintéticas diferentes utilizando materiales de partida disponibles comercialmente y/o materiales de partida preparados mediante métodos sintéticos convencionales. En los esquemas siguientes se describen diversos ejemplos de rutas sintéticas que se pueden utilizar para sintetizar los compuestos descritos en este documento.

EJEMPLO 1 – PREPARACIÓN DE LOS ADC

A. PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS MARCADOS

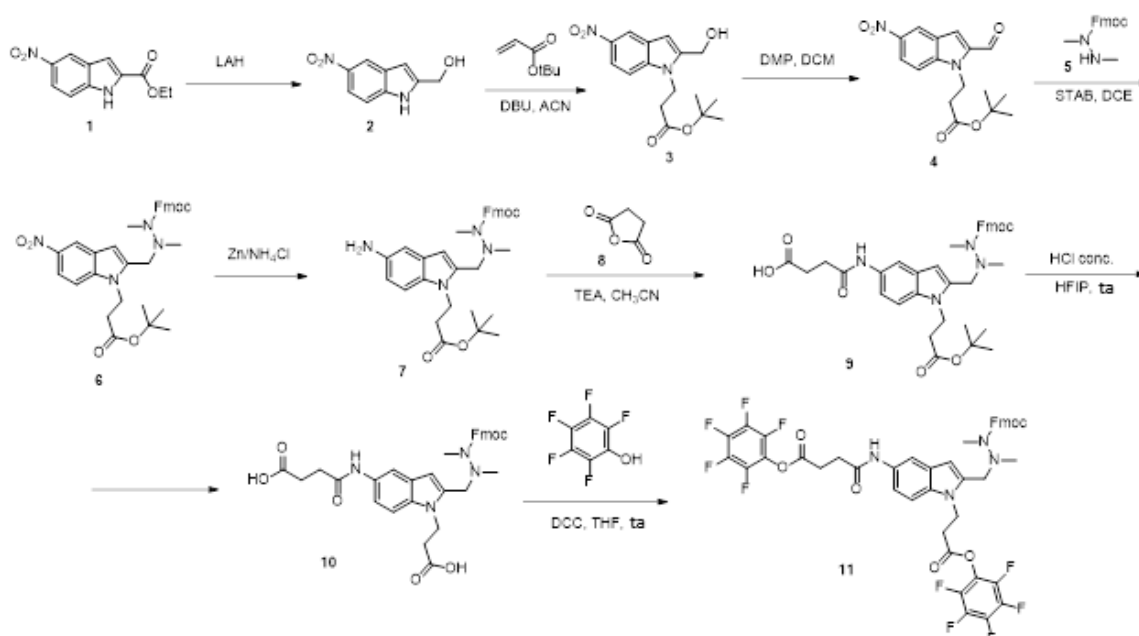
Los anticuerpos marcados se prepararon de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, como los descritos en Rabuka D. et al., «Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags», *Nat Protoc.*, 2012; 7(6):1052-1067 y en la Patente de EE. UU. N.º 7.985.783 B2, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia. En resumen, un anticuerpo que contiene un motivo de sulfatasa heterólogo se puede poner en contacto con una enzima generadora de formilglicina para convertir una cisteína o serina en el motivo en una formilglicina que tiene un resto de aldehído, generando así un «anticuerpo marcado con aldehído». Se puede utilizar cualquier enzima generadora de formilglicina, como *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium tuberculosis*.

B. SÍNTESIS DE LA FÓRMULA (IIA) ENLACE-CARGA ÚTIL

Materiales y métodos

Los reactivos sintéticos se adquirieron de Sigma-Aldrich, Acros, AK Scientific u otras fuentes comerciales y se utilizaron tal como se recibieron. Los disolventes anhidros se obtuvieron de fuentes comerciales en botellas selladas. El compuesto **12** (informado previamente en Chuprakov et al. *Bioconjugate Chem.* **2021**, 32, 746-754) se obtuvo comercialmente de Shanghai Medicilon

y se utilizó sin purificación. Tanto el belotecan **13** como los compuestos **16** y **17** se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron tal como se recibieron. La cromatografía en columna se realizó utilizando un sistema de cromatografía Biotage Isolera o Biotage Selekt. Los espectros de masas de baja resolución (LRMS) se adquirieron en un LC/MS cuadrupolo Agilent Technology 6120, equipado con un sistema HPLC Agilent 1260 Infinity, un detector de longitud de onda variable G1314 y una columna Agilent Poroshell 120 SB C18 de 4,6 mm x 50 mm a temperatura ambiente utilizando un gradiente de 10-100 % de agua y acetonitrilo que contenía 0,1 % de ácido fórmico. Los HPLC se monitorearon a 254 o 205 nm.



ESQUEMA 1

Preparación de (5-nitro-1H-indol-2-il)metanol (**2**)

A un matraz de fondo redondo secado al horno se agregó 5-nitro-1H-indol-2-carboxilato de etilo (**1**, 25 g, 107 mmol) y 250 mL de THF anhidro. La solución resultante se enfrió a 0°C y se trató con hidruro de litio y aluminio (4,9 g, 129 mmol) en pequeñas porciones durante 30 minutos con agitación vigorosa bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, se vertió en 100 mL de agua y se extrajo con acetato de etilo (400 mL). La capa orgánica se concentró al vacío y se purificó en gel de sílice (75 % v/v EtOAc/hexano) para obtener 14 g (73 mmol, rendimiento de 68 %) del producto **2** como un sólido marrón. LRMS (ESI): *m/z* 192,9 [M+H]⁺, calculada para C₉H₈N₂O₃ *m/z* 193,1.

Preparación de 3-(2-(hidroximetil)-5-nitro-1H-indol-1-il)propanoato de *tert*-butilo (**3**)

En un matraz de fondo redondo secado al horno se combinaron 5-nitro-1H-indol-2-il)metanol (**2**, 14 g, 73 mmol), 140 mL de acetonitrilo y 12 g (94 mmol) de acrilato de *tert*-butilo. La solución resultante se trató con DBU (16,6 g, 109 mmol) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La

mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 3 h, luego se vertió en 100 mL de agua y se concentró a presión reducida para eliminar el acetonitrilo. Luego, el residuo acuoso se extrajo con diclorometano (300 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó en sulfato de sodio, se concentró al vacío y se purificó en gel de sílice (25 % v/v EtOAc-hexano) para proporcionar 18 g (56 mmol, 77 % de rendimiento) del producto **3** como un sólido amarillo. LRMS (ESI): m/z 320,9 $[M+H]^+$, calculada para $C_{16}H_{20}N_2O_5$ m/z 321,1.

Preparación de 3-(2-formil-5-nitro-1H-indol-1-il)propanoato de terc-butilo (4)

A una solución agitada del compuesto **3** (18 g, 56 mmol) en 200 mL de DCM anhidro se añadió peryodinano de Dess-Martin (28 g, 66 mmol) en pequeñas porciones durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se enfrió añadiendo 100 ml de agua. La capa acuosa se extrajo con DCM (200 mL), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio. Después de eliminar los disolventes, el residuo se purificó en gel de sílice (0-25 % v/v EtOAc-hexanos) para proporcionar 14 g (41 mmol, rendimiento de 73 %) de aldehído **4** como un sólido amarillo. LRMS (ESI): m/z 340,9 $[M+Na]^+$, calculado para $C_{16}H_{18}N_2O_5$ m/z 341,1.

Preparación de 1,2-dimetilhidrazina-1-carboxilato de (9H-fluoren-9-il)metilo (5)

A una solución de diclorhidrato de 1,2-dimetilhidrazina (20 g, 150 mmol) en DCM (200 mL) a 25 °C se le añadió trietilamina (45,6 g, 452 mmol) lentamente durante 10 min. La mezcla se agitó a 25 °C durante 30 min y se trató con (9H-fluoren-9-il)metilcarbonocloruro (cloruro de Fmoc, 19,4 g, 75 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (300 mL) y se extrajo con acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica combinada se secó en sulfato de sodio, se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (elución con 30 % v/v EtOAc-hexanos) para proporcionar el compuesto **5** (20 g, 71 mmol, rendimiento de 95 %) como un sólido amarillo con bajo punto de fusión. LRMS (ESI): m/z 283,2 $[M+H]^+$, calculada para $C_{17}H_{18}N_2O_2$ m/z 283,1.

Preparación de 2-((1-(3-(terc-butoxi)-3-oxopropil)-5-nitro-1H-indol-2-il)metil)-1,2-dimetilhidrazina-1-carboxilato de (9H-fluoren-9-il)metilo (6)

En un matraz de fondo redondo secado al horno se combinaron el aldehído **4** (14 g, 41 mmol) y la hidrazina **5** (11 g, 39 mmol) en 140 ml de DCE anhidro a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 hora y luego se trató con STAB (17 g, 80 mmol) en porciones durante 30 minutos. La agitación continuó durante 2 h a temperatura ambiente, luego la mezcla de reacción se extinguió con 100 mL de agua, la capa acuosa se extrajo con DCM (300 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. Después de eliminar los disolventes, el residuo se purificó en gel de sílice (0-25 % v/v EtOAc-hexano) para obtener 18 g (31 mmol, rendimiento de 80 %) del compuesto **6** como un sólido marrón. LRMS (ESI): m/z 584,9 $[M+H]^+$, calculada para $C_{33}H_{36}N_4O_6$ m/z 585,3.

Preparación de (9H-fluoren-9-il)metil 2-((5-amino-1-(3-(terc-butoxi)-3-oxopropil)-1H-indol-2-

il)metil)-1,2-dimetilhidrazina-1-carboxilat (7)

Una solución del compuesto nitro **6** (18 g, 31 mmol) en 180 mL de THF se combinó con una solución de cloruro de amonio (13 g, 243 mmol) en 180 mL de agua y 90 mL de metanol a temperatura ambiente. La mezcla resultante se trató con polvo de zinc (16 g, 245 mmol) en varias porciones a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 2 horas, los sólidos se filtraron, el filtrado se concentró al vacío y se repartió entre cloruro de amonio acuoso saturado (100 ml) y acetato de etilo (100 ml). La capa acuosa se separó y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). La capa orgánica se lavó con agua y salmuera y luego se secó en sulfato de magnesio. La eliminación de disolventes al vacío proporcionó 15 g de producto crudo **7** como un aceite marrón que se utilizó posteriormente sin purificación. LRMS (ESI): m/z 555,3 $[M+H]^+$, calculado para $C_{33}H_{38}N_4O_4$ m/z 555,3.

Preparación de ácido 4-((2-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-1,2-dimetilhidrazineil)metil)-1-(3-(terc-butoxi)-3-oxopropil)-1H-indol-5-il)amino)-4-oxobutanoico (9)

A una solución del compuesto **7** (1,0 g, 1,8 mmol) en MeCN (10 mL) se añadieron anhídrido succínico (905 mg, 5,0 equiv., 9 mmol) y trietilamina (1,2 mL, 9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (columna C18, 0-100 % v/v MeCN/H₂O con 0,05 % TFA). Las fracciones puras se combinaron, se concentraron a presión reducida hasta que quedaron turbias y se liofilizaron para obtener 0,95 g del producto **9** (1,5 mmol, rendimiento del 83 %) como un sólido blanquecino. LRMS (ESI): m/z 677,3 $[M+Na]^+$, calculada para $C_{37}H_{42}N_4O_7$ m/z 677,3.

Preparación de ácido 4-((2-((2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-1,2-dimetilhidrazinil)metil)-1-(2-carboxietil)-1H-indol-5-il)amino)-4-oxobutanoico (10)

El compuesto **9** (9 g, 14 mmol) se disolvió en 90 mL de hexafluoroisopropanol y se trató con 10 mL de HCl concentrado a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, luego, se eliminó el disolvente al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18, 0-100 % v/v CH₃CN-H₂O con 0,05 % TFA). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para dar el diácido **10** (6,5 g, 11 mmol, rendimiento del 79 %) como un sólido de color tostado. LRMS (ESI): m/z 621,3 $[M+Na]^+$, calculada para $C_{33}H_{34}N_4O_7$ m/z 621,2.

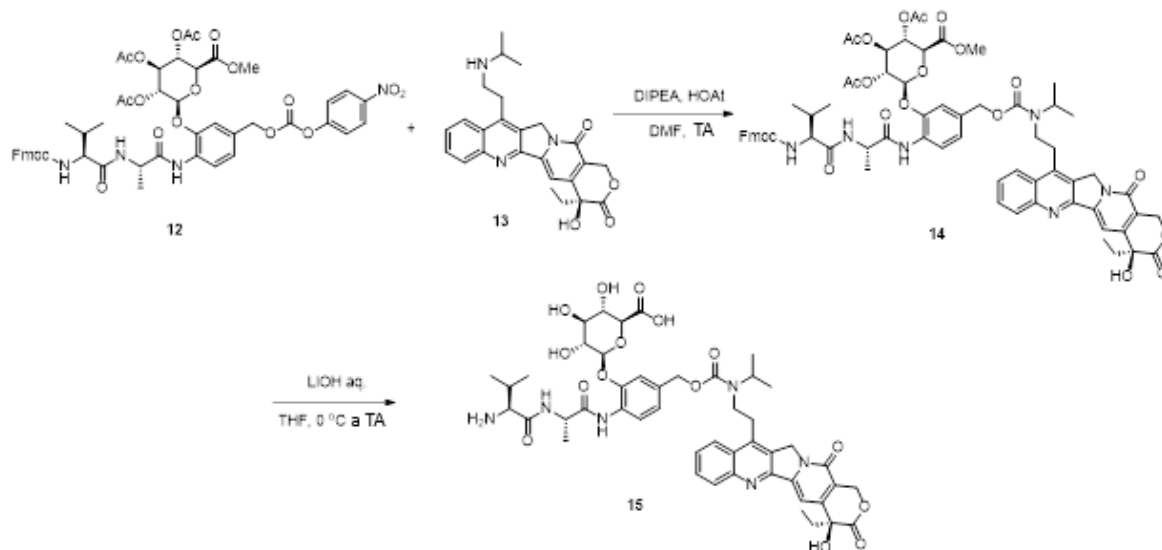
Preparación de 1,2-dimetil-2-((1-(3-oxo-3-(perfluorofenoxi)propil)-5-(4-oxo-4-(perfluorofenoxi)butanamido)-1H-indol-2-il)metil)hidrazina-1-carboxilato de (9H-fluoren-9-il)metilo (11)

Una solución de diácido **10** (2,0 g, 3,34 mmol) en 40 mL de THF anhidro se combinó con 6,2 g (33,4 mmol) de pentafluorofenol. La mezcla se agitó y se trató con DCC (2,0 g, 10 mmol) en unas pocas porciones pequeñas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente, luego todos los sólidos se eliminaron por filtración y se lavaron con THF en el filtro. Los filtrados combinados se concentraron al vacío y se purificaron por

cromatografía en gel de sílice (gradiente de 0-25-35 % de EtOAc-hexanos) para dar 2,4 g de éster de bis-PFP **11** (2,6 mmol, rendimiento del 77 %) como un sólido espumoso blanco. LRMS (ESI): m/z 931,2 $[M+H]^+$, calculado para $C_{45}H_{32}F_{10}N_4O_7$ m/z 931,2.

Síntesis de la carga activa del enlazador (IIa)

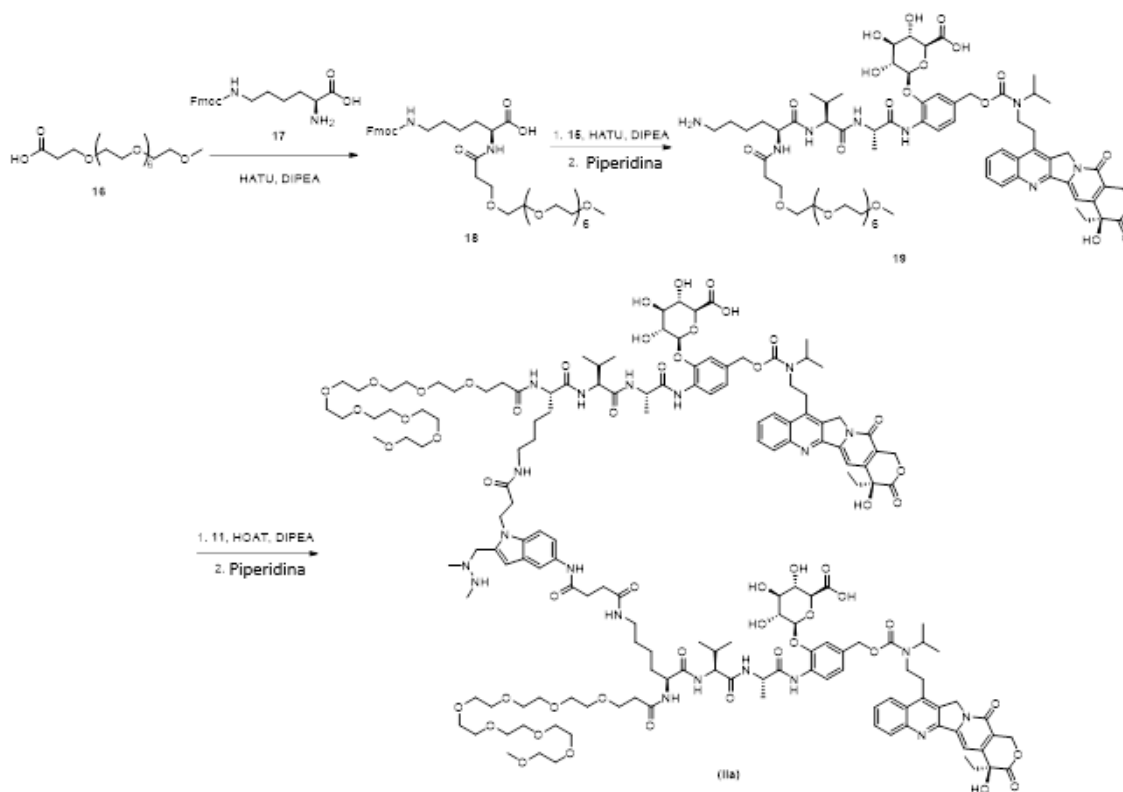
*Preparación del ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)-5-((((2-((S)-4-etil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahydro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-11-il)etil)(isopropil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**15**)*



Se suspendió clorhidrato de belotecán **13** (2,35 g, 5,0 mmol) en una mezcla de 30 mL de DMF anhidro y 1,75 mL de DIPEA (10 mmol). La mezcla resultante se agitó y se trató con HOAt (0,68 g, 5 mmol), seguido de PNP-carbonato **12** (5,1 g, 5 mmol) en pequeñas porciones a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h hasta que se consideró que los materiales de partida se habían consumido por completo según el análisis de HPLC. La mezcla se vertió sobre 300 mL de hielo con agitación vigorosa, el precipitado amarillento resultante se recogió por filtración, se lavó con 30 mL de agua dos veces, se secó al aire durante la noche para dar 6,7 g del producto de acoplamiento crudo **14** como un polvo amarillo claro. LRMS (ESI): m/z 1307,5 $[M+H]^+$, calculado para $C_{69}H_{74}N_6O_{20}$ m/z 1307,5.

Una solución del intermedio crudo **14** (6,7 g) en 30 mL de THF se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y se trató lentamente con una solución acuosa de hidróxido de litio 2 M (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h, luego se agregaron otros 10 mL de solución de LiOH 2 M y se continuó agitando durante 15 minutos antes de calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y agregar otros 10 mL de hidróxido de litio 2 M y 5 mL de metanol. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se enfrió agregando una solución acuosa de HCl 2 M a pH 2-3 y se dejó agitar durante 30 minutos. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con MTBE (2x50 mL). La capa acuosa se separó y se

purificó directamente mediante cromatografía de fase inversa (columna C18, 0-40 % CH₃CN-H₂O con 0,05 % TFA). Las fracciones puras se combinaron, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron para obtener 3,4 g del producto **15** (3,6 mmol, rendimiento del 72 % en 2 pasos) como un polvo esponjoso de color amarillo brillante. LRMS (ESI): m/z 945,4 [M+H]⁺, calculada para C₄₇H₅₆N₆O₁₅ m/z 945,4.



ESQUEMA 2

Preparación de N⁶-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-N²-(3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)propanoil)-L-lisina (**18**)

El ácido carboxílico **16** (5,0 g, 12 mmol) se disolvió en DMF anhidro (10 mL) y se trató con DIPEA (2,1 mL, 12 mmol), seguido de HATU (4,6 g, 12 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos y luego se combinó con H-Lys(Fmoc)-OH **17** sólido (4,5 g, 12 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a TA y, luego, se purificó directamente mediante cromatografía de fase inversa (columna C18, 0-70 % CH₃CN-H₂O con 0,05 % TFA). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y los disolventes se eliminaron al vacío. El residuo se secó a alto vacío durante la noche para dar el producto **18** (5,5 g, 7,2 mmol, rendimiento del 60 %) como un aceite transparente e incoloro. LRMS (ESI): m/z 763,4 [M+H]⁺, calculada para C₃₉H₅₈N₂O₁₃ m/z 763,4.

Preparación de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(((2S,31S,34S)-28-(4-aminobutil)-31-isopropil-34-metil-26,29,32-trioxo-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxa-27,30,33-triazapentatriacontan-35-amido)-5-(((2-((S)-4-etil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-11-il)etil)(isopropil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-

carboxílico (19)

El ácido carboxílico **18** (2,9 g, 3,8 mmol) se combinó con DIPEA (1,3 mL, 7,6 mmol) y HATU (1,45 g, 3,8 mmol) en 12 mL de DMF anhidro a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 20 minutos antes de combinarla con una solución del compuesto **15** (3,3 g, 3,5 mmol) en 15 mL de DMF. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se trató con 13 mL de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 7 h hasta que la reacción se consideró completa mediante análisis LCMS. Luego, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar la trietilamina y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (columna C18, 0-40 % CH₃CN-H₂O con 0,05 % TFA). Las fracciones puras se combinaron, se concentraron a presión reducida hasta un volumen final de ~100 mL y se liofilizaron para obtener 3,5 g del producto **19** como un polvo claro de color amarillo brillante (2,4 mmol, rendimiento del 69 % en 2 pasos). LRMS (ESI): m/z 1467,7 [M+H]⁺, calculada para C₇₁H₁₀₂N₈O₂₅ m/z 1467,7.

Preparación de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(((2S,3S,4S)-28-(4-(3-(5-((S)-28-(((S)-1-(((S)-1-(((2-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-4-(((2-((S)-4-etil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahydro-2H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-11-il)etil)(isopropil)carbamoil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-26,34-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxa-27,33-diazaheptatriacontan-37-amido)-2-(((1,2-dimetilhidrazineil)metil)-1H-indol-1-il)propanamido)butil)-31-isopropil-34-metil-26,29,32-trioxa-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxa-27,30,33-triazapentatriacontan-35-amido)-5-(((2-((S)-4-etil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahydro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-11-il)etil)(isopropil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (20)

A una solución agitada del compuesto **19** (3,5 g, 2,4 mmol) en 16 mL de DMA anhidro se añadieron DIPEA (0,84 mL, 4,8 mmol) y HOAt (0,33 g, 2,4 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se trató con una solución preparada por separado de éster bis-PFP **11** éster (1,0 g, 1,1 mmol en 2 mL de DMA) en unas pocas porciones pequeñas con intervalos de 10 minutos entre adiciones. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se trató con 2,1 mL de piperidina (22 mmol). Después de 20 minutos, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante cromatografía de fase inversa (columna C18, 0-40 % CH₃CN-H₂O con 0,05 % TFA). Las fracciones puras se combinaron, se concentraron a presión reducida a 30 °C y se liofilizaron para obtener 3,2 g de carga activa del enlazador (**IIa**) como un polvo esponjoso de color amarillo brillante (0,98 mmol, 89 % de rendimiento de dos pasos basado en **11**). LRMS (ESI): m/z 1638,3 [M+H]²⁺, calculado para C₁₆₀H₂₂₄N₂₀O₅₃ m/z 1638,8.

C. BIOCONJUGACIÓN Y PURIFICACIÓN DE TF-ADC

Los anticuerpos marcados con aldehído (15 mg/ml) se conjugaron con fármacos enlazadores sintetizados (17,5 equivalentes molares de fármaco:anticuerpo para DAR4 y 22,5 equivalentes molares de fármaco:anticuerpo para DAR8) haciendo reaccionar el fármaco enlazador y el

anticuerpo marcado con aldehído durante 72 horas a 37 °C en 67 mM de citrato de sodio, pH 5,5, 43 mM de cloruro de sodio que contenía 3,5 o 4,5 % de DMA.

Después de la conjugación, el fármaco libre residual se eliminó por diafiltración mediante el uso de un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Labscale de 115 V (Millipore, Cat. n.º XX42LSS11) con un casete TFF de 30 kDa (Sigma-Aldrich, Cat. n.º P3C030C00, área de filtración 88 cm², NMWCO 30 kDa) e intercambiando 12 diavolúmenes (600 mL) en citrato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 50 mM.

Después de la purificación de TFF, se midió que la muestra **TF-ADC 6-4** tenía aproximadamente un 2,5 % de carga activa libre, mientras que la muestra **TF-ADC 6-8** tenía aproximadamente un 18,5 % de carga activa libre.

En algunas modalidades, el fármaco libre residual se eliminó aún más utilizando SEC-FPLC (HiLoad 26/600 Superdex®200) seguido de concentración utilizando filtros centrífugos de corte de peso molecular (MWCO) de 30 kD de 0,5 mL de AMICON® (Millipore Sigma, Cat. No. #UFC5030BK). Después de la purificación FPLC, se midió que las muestras de TF-ADC tenían aproximadamente un 1,4 % de carga activa libre.

En algunas modalidades, se utiliza además la cromatografía de intercambio iónico para purificar las muestras de TF-ADC.

Para determinar la relación fármaco-anticuerpo (DAR) del producto final, se examinaron los conjugados anticuerpo-fármaco mediante cromatografía de interacción hidrofóbica analítica (HIC) o cromatografía de fase inversa polimérica (PLRP).

La columna HIC (Tosoh Bioscience, Cat. No. 14947) se hizo funcionar con sulfato de amonio 1,5 M y fosfato de sodio 25 mM (pH 7,0) como fase móvil A y isopropanol 25 % y fosfato de sodio 18,75 mM (pH 7,0) como fase móvil B. La columna PLRP (Agilent, Cat. No. PL1912-1802) se hizo funcionar con ácido trifluoroacético al 0,1 % en H₂O como fase móvil A y ácido trifluoroacético al 0,1 % en CH₃CN para la fase móvil B, con la columna calentada a 80 °C.

En algunas modalidades, la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) analítica se realizó como se describe a continuación: las muestras se analizaron en un instrumento Agilent 1100 equipado con una columna de gel butil-NPR TSK de 4,6 mm x 35 mm de Tosoh (n.º 14947) mantenida a 25 °C. Las muestras se prepararon agregando 20 µL de 50 mM NaCl (pH 5,5) y 20 µL de Fase Móvil A a 20 µg de muestra y se inyectaron a temperatura ambiente. La elución en gradiente utilizó la fase móvil A (ácido trifluoroacético al 0,1 % en H₂O) y la fase móvil B (ácido trifluoroacético al 0,1 % en CH₃CN) en el programa informado en la tabla a continuación a un caudal de 1,0 ml/minuto. La detección se realizó mediante UV a 215 nm, 252 nm y 280 nm.

En algunas modalidades, se realizó cromatografía de interacción hidrofóbica analítica (HIC) (Tosoh n.º 14947) con detección UV/Vis. La forma reducida del producto final se analizó mediante cromatografía líquida de fase inversa (RP-HPLC) (Agilent Cat. No. PL1912-1802) con detección UV/Vis para verificar DAR.

TABLA E1. PROGRAMA DE ELUCIÓN POR GRADIENTE PARA ANÁLISIS DE HIC

Tiempo (min)	Fase móvil B (%)
0,0	12
5,5	42
7,5	70
8,5	100
9,5	100
10	12
12	12

En algunas modalidades, la HPLC de fase inversa se realizó tal como se describe a continuación: las muestras se analizaron en un instrumento Agilent 1100 equipado con una columna PL1912-1802 de 50 x 2,1 mm (8 µm, 1000 Å) de Agilent mantenida a 80 °C. Las muestras se prepararon agregando 10 µL de una mezcla de 0,5 mM de DTT, 50 µL de 8 M de guanidina HCl, 130 mM de tris y 1 mM de EDTA (pH 7,6) a una muestra de 20 µg y agregando PBS a un volumen final de 100 µL. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos después de su preparación. La elución en gradiente utilizó la fase móvil A (25 mM Na₃PO₄, 1,5 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,0) y la fase móvil B (18,75 mM Na₃PO₄, pH 7,0, 25 % de alcohol isopropílico) en el programa informado en la tabla a continuación a un caudal de 2,0 ml/minuto. La detección se realizó mediante UV a 215 nm, 252 nm y 280 nm.

Tiempo (min)	Fase móvil B (%)
0,0	25
8	50
8,1	95
10	95

La siguiente tabla informa la DAR para cada ADC evaluado.

TABLA E2. LOTES DE PRUEBA REPRESENTATIVOS

ADC	Título (mg/L) ronda 1	Título (mg/L) ronda 2	DAR	% Agregado	HIC R _t (mAb) [^]	Fase inversa R _t (LC) [^]	Fase inversa R _t (HC) [^]
TF-ADC 6-8	240	389	6,56	3,7	6,1	7,0	6,6
TF-ADC 7-8	336	305	6,53	3,2	5,7	6,2	6,7
TF-ADC 6-4	420	430	3,4	3,8			
TF-ADC 7-	355	297	3,14	4,4			

ADC	Título (mg/L) ronda 1	Título (mg/L) ronda 2	DAR	% Agregado	HIC R _t (mAb)^	Fase inversa R _t (LC)^	Fase inversa R _t (HC)^
4							

Para determinar la agregación, las muestras se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Tosoh Bioscience, Cat. No. 08541) utilizando una fase móvil de 300 mM de NaCl, fosfato de sodio 25 mM y 5% de isopropanol (pH 6,8).

Los resultados representativos se proporcionan en las tablas siguientes. En una ejecución ilustrativa, se produjeron 2,1 g de **TF-ADC 6-4** y 1,2 g de **TF-ADC 6-8**, cada uno de los cuales tenía una concentración superior a 12 mg/mL.

TABLA E3. DESPUÉS DE TFF – LOTES DE PRUEBA REPRESENTATIVOS

ADC	Concentración (mg/mL)	DAR (RP, HIC)	Agregación (%)	Endotoxina (EU/mg)	Fármaco libre (%)	Cantidad total (g)	Rendimiento de purificación de ADC (%)
TF-ADC 6-4	13,0	3,7, 3,7	5,2	< 0,01	1,5, 3,4	2,7	78,4
TF-ADC 6-8	13,9	7,0, 7,4	2,9	0,01	15, 22	1,7	72,1

TABLA E4. DESPUÉS DE SEC-FPLC – LOTES DE PRUEBA REPRESENTATIVOS

ADC	concentración (mg/mL)	DAR (RP, HIC)	Agregación (%)	Endotoxina (EU/mg)	Fármaco libre (%)	Cantidad total (g)
TF-ADC 6-8	8,96	7,07, 7,06	4,0	0,02	1,4	1,4

TABLA E5. RELACIONES FÁRMACO-ANTICUERPO (DAR) Y % DE ESPECIES DE ALTO PESO MOLECULAR (% HMW) - LOTES DE PRUEBA REPRESENTATIVOS.

Nombre de la muestra	Concentración (mg/mL)	DAR (PLRP)	% HMW (S)	Endotoxina (EU/mg)
FITC-ADC 8	2,58	6,50	2,3	< 0,19
TF-ADC 6-8	2,56	6,56	3,7	< 0,19
TF-ADC 7-8	2,73	6,53	3,2	< 0,19
FITC-ADC 4	3,96	3,45	2,4	0,29
TF-ADC 6-4	2,65	3,40	3,8	< 0,19
TF-ADC 7-4	2,61	3,14	4,4	< 0,20

TABLA E6.

Fármaco/ Enlazador	Ab	Sitio(s) con etiqueta	DAR	% agregado	Concentración mg/mL	EU (mg)	Nota
Ila	FITC	CH1/CT	6,5	2,3	2,58	< 0,19	En la presente se denomina isotipo o isotipo 2
TF-ADC-6-8		CH1/CT	6,56	3,7	2,56	< 0,2	
Ila	EXMA-006						
TF-ADC-7-8		CH1/CT	6,53	3,2	2,73	< 0,18	
Ila	EXMA-007						
Ila	FITC	CH1	3,45	2,4	3,96	0,29	En la presente se denomina isotipo o isotipo 1
TF-ADC-6-4		CH1	3,4	3,8	2,65	< 0,19	
Ila	EXMA-006						
TF-ADC-7-4		CH1	3,14	4,4	2,61	< 0,19	
Ila	EXMA-007						

EJEMPLO 2 - CARACTERIZACIÓN DE TF-ADC

Las muestras para experimentos de desplazamiento térmico de proteínas (temperatura de fusión) se prepararon utilizando el kit de tinte APPLIED BIOSYSTEMS™ PROTEIN THERMAL SHIFT™ (ThermoFisher Scientific Cat. No. 4461146). Los datos se recopilaron utilizando un instrumento QUANTSTUDIO™ 3 (ThermoFisher Scientific Cat. No. A28567) con el software PROTEIN THERMAL SHIFT™ v1.4 (ThermoFisher Scientific Cat. No. 466038). Brevemente, el colorante PROTEIN THERMAL SHIFT™ (1000X) se diluyó en agua a 8X en agua desionizada. Las muestras se prepararon en hielo combinando 5 µL de tampón PROTEIN THERMAL SHIFT™, 12,5 µL de solución de proteína (a 1 mg/mL) y 2,5 µL del colorante PROTEIN THERMAL SHIFT™ diluido (8X) para un volumen total de solución de reacción de 20 µL. La solución de reacción se mezcló 10 veces con una pipeta. Luego, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto y luego se incubaron en hielo hasta su análisis. Las muestras se cargaron en la placa del

instrumento, que luego se cargaron en un instrumento QUANTSTUDIO™ 3 Real-Time PCR System. Los datos se recopilaron utilizando el experimento de curva de fusión estándar con las siguientes condiciones: Temperatura del paso 1: 25 °C durante 2 minutos; Temperatura del paso 2: 99 °C durante 2 minutos con modo de rampa rápida continua (Paso 1: 1,6 °C/seg; Paso 2: 0,05 °C/seg). Los datos de temperatura de fusión sin procesar se deconvolucionaron dentro del software de análisis QUANTSTUDIO™ 3.

La siguiente tabla informa la temperatura de fusión medida de los ADC.

TABLA E7.

Construcción	CH2 T _m (°C)	Fab T _m (°C)
EXMA-006	71	75,6
TF-ADC 6-4 (DAR 3,68)	-	67,5*
TF-ADC 6-8 (DAR 7,07)	64	72,5

* CH2 y Fab T_m se fusionaron

EJEMPLO 3 – UNIÓN DE TF-ADC A TF

Se emplearon ensayos de unión para determinar la afinidad relativa de cada TF-ADC obtenido en los ejemplos anteriores a una proteína TF. Se probaron por separado las proteínas TF de cuatro especies, incluidas la humana, la cynomolgus (cyno), la del ratón y la rata. Se probó un anticuerpo contra TF libre de una construcción de enlace de fármaco en paralelo con los ADC, que sirvió como control. También se utilizó como control negativo el anticuerpo anti-FITC conjugado con el mismo constructo de carga activa del enlazador.

Se produjeron las proteínas TF. La interacción del TF-ADC (o el anticuerpo contra TF) con la proteína TF (por ejemplo, un TF humano, de cynomolgus (cyno), de ratón o de rata) se controló utilizando un instrumento Octet (Pall ForteBio). Para estos ensayos, se inmovilizaron 36 nM de anticuerpo en sensores anti-Fc humano (AHC) en tampón cinético 1X (ForteBio). Luego, los sensores se sumergieron en pocillos que contenían una dilución en serie 3X de la proteína TF que oscilaba entre 1 µM y 1,37 nM. Se permitió que la asociación alcanzara el equilibrio. Luego, los sensores se trasladaron a pocillos que contenían solo un tampón cinético 1X y se dejaron disociarse hasta alcanzar el equilibrio. Se midieron las tasas de asociación y disociación y a partir de éstas, se calcularon las K_D monovalentes utilizando el software de análisis integrado (ForteBio).

En las tablas siguientes se muestran datos ilustrativos.

TABLA E8A. AFINIDAD DE UNIÓN CUALITATIVA POR OCTET

Ligando	Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
EXMA-006 – lote representativo 1	Factor tisular de Cynomolgus	7,10E+5	4,78E-04	6,73E-10
EXMA-006 – lote representativo 1	Factor tisular humano	8,31E+05	9,38E-04	1,13E-09
EXMA-006 – lote representativo 1	Factor tisular de ratón	7,55E+05	0,08101	1,07E-07
EXMA-006 – lote representativo 1	Factor tisular de rata	NA	NA	NA

TABLA E8B. AFINIDAD DE UNIÓN CUALITATIVA POR OCTET

Ligando	Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
EXMA-006 – lote representativo 2	Factor tisular de Cynomolgus	9,4E+03	2,2E-01	2,4E-04
EXMA-006 – lote representativo 2	Factor tisular humano	6,5E+03	2,3E-01	3,6E-05
EXMA-006 – lote representativo 2	Factor tisular de ratón	3,2E+02	6,3E-01	2,0E-03
TF-ADC 6-4	Factor tisular de Cynomolgus	1,4E+04	1,6E-01	1,1E-05
TF-ADC 6-4	Factor tisular humano	8,2E+03	1,3E-01	1,6E-05
TF-ADC 6-4	Factor tisular de ratón	3,3E+03	4,7E-01	1,4E-04
TF-ADC 6-8	Factor tisular de Cynomolgus	1,0E+04	1,9E-01	1,9E-05
TF-ADC 6-8	Factor tisular humano	1,5E+04	1,1E-01	7,1E-06
TF-ADC 6-8	Factor tisular de ratón	2,5E03	5,4E-01	2,1E-04

EJEMPLO 4 - ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO (PK) DE TF-ADC EN RATAS

A ratas Sprague-Dawley macho (3 por grupo) se les administró por vía intravenosa un único bolo de 5 mg/kg del TF-ADC producido como se describe en los ejemplos anteriores. El plasma estabilizado con K2EDTA se recogió a las 0,5 h, 6 h y 24 h, y 2, 4, 7, 10, 14 y 21 días después de la dosis.

Las concentraciones de anticuerpo total y ADC total se cuantificaron mediante ELISA. Para las mediciones de anticuerpos totales, los conjugados se capturaron con un anticuerpo específico anti-IgG humana y se detectaron con un anticuerpo específico anti-Fc humana conjugado con HRP. Para las mediciones de ADC total, los conjugados se capturaron con un anticuerpo específico anti-Fab humano y se detectaron con un anticuerpo primario anti-carga activa de ratón,

seguido de un anticuerpo secundario específico anti-IgG de subclase 1 de ratón conjugado con HRP. El anticuerpo secundario unido se detectó utilizando el sustrato Ultra TMB One-Step ELISA (ThermoFisher). Después de apagar la reacción con ácido sulfúrico, se leyeron las señales tomando la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Molecular Devices Spectra Max M5 equipado con el software SoftMax Pro. Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism y Microsoft Excel y se graficaron en las **FIGS. 3A-3D**.

EJEMPLO 5 – EFICACIA *IN VITRO* DE LOS TF-ADC EN MODELOS DE XENOINJERTO DERIVADOS DE LÍNEAS CELULARES

Se sembraron varias líneas de células cancerosas en placas de 96 pocillos (Costar 3610) a una densidad de $1,5 \times 10^3$ células/pocillo en 100 μ L de medio de crecimiento. Al día siguiente, las células se trataron con 20 μ L de compuestos de prueba diluidos en serie en medio. Después de la incubación a 37 °C con 5% de CO₂ durante 5 días, se midió la viabilidad utilizando el reactivo Promega CellTiter Glo® de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las curvas GI₅₀ se calcularon en GraphPad Prism normalizadas a la concentración de carga activa. Los gráficos de los ensayos de citotoxicidad (% de viabilidad frente a concentración del fármaco (nM)) se muestran en las **FIGS. 4-8**.

TABLA E9. PROPIEDADES BIOFÍSICAS E IC₅₀ DE LOS TF-ADC PARA EL EXPERIMENTO DE «DAR» *IN VITRO*

Nivel de DAR	Muestra	DAR	IC ₅₀ (nM) - concentración de fármaco			IC ₅₀ (nM) - concentración de Ab		
			A431	HPAF-II	BxPC-3	A431	HPAF-II	BxPC-3
	FITC-ADC 8	6,36	alto	alto	alto	alto	alto	alto
alto	TF-ADC 6-8	7,09	1,635	1,223	1,361	0,251	0,189	0,209
medio	TF-ADC 6-8	6,56	1,273	1,462	1,231	0,182	0,209	0,176
bajo	TF-ADC 6-8	4,61	1,897	0,803	1,693	0,410	0,176	0,367
muy bajo	TF-ADC 6-8	2,71	17,910*	1,243	2,076	6,529*	0,454	0,763
	belotecán		2,363	3,042	2,625	2,363	3,042	2,625
	FITC-ADC 4	3,39	alto	alto	132,600*	0,007*	alto	67,640*
alto	TF-ADC 6-4	3,61	2,682	1,411	1,612	0,787	0,415	0,466
medio	TF-ADC 6-4	3,4	1,680	0,859	1,087	0,463	0,240	0,302
bajo	TF-ADC 6-4	1,89	129,100	0,879	1,955	67,870*	0,457	1,028
muy bajo	TF-ADC 6-4	0,73	109,700	0,011*	5406,0*	187,70*	0,012*	7054,0*
	belotecán		2,620	2,448	2,557	2,620	2,448	2,557

*Indica cuándo es probable que los valores de IC_{50} no sean precisos debido a la forma de la curva

Se evaluó además el efecto de eliminación del observador que muestra la eliminación de células adyacentes no objetivo (es decir, que no expresan TF) por la carga activa liberada que fue absorbida por la célula objetivo. Brevemente, un cocultivo de la línea celular positiva objetivo MDA-MB-231 y la línea celular negativa objetivo Jurkat se trataron con los ADC como se describe en este documento o un control de vehículo, y la citotoxicidad de las células Jurkat tratadas se evaluó utilizando TrypLE™ y se normalizó con respecto al control de vehículo. El **TF-ADC 6-8** mostró importantes actividades de eliminación de células espectadoras con una IC_{50} de alrededor de 1,203 nM, mientras que un ADC de referencia (CAS 1418731-10-8 e INN 10148) mostró una IC_{50} de alrededor de 0,3154 nM. También se evaluó en paralelo la citotoxicidad del ADC en el monocultivo de Jurkat. El **TF-ADC 6-8** mostró una IC_{50} de alrededor de 7,755 nM, mientras que el ADC de referencia mostró una IC_{50} de alrededor de 17,73 nM.

EJEMPLO 6 – EFICACIA *IN VIVO* DE LOS TF-ADC EN MODELOS DE XENOINJERTO DERIVADOS DE LÍNEAS CELULARES

Modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas BxPC3: Se inocularon ratones BalbC/sin tratamiento previo hembras (n=8 por grupo) con 1×10^7 células tumorales BxPC3 en una matriz MATRIGEL® 1:1. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 150-200 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente a los respectivos grupos de tratamiento y recibieron una única inyección intravenosa de vehículo, control de isotipo o 10 mg/kg de ADC. No hubo efectos adversos sobre el peso corporal en ninguno de los grupos de tratamiento durante el transcurso del estudio. Los efectos de **TF-ADC 6-4**, **TF-ADC 7-4**, **TF-ADC 6-8** y **TF-ADC 7-8** sobre la regresión y supresión tumoral se muestran en **las FIGS. 9A-9F**.

Modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas HPAF-II Se inocularon ratones BalbC/sin tratamiento previo hembras (n=8 por grupo) con 1×10^7 células tumorales HPAF-II en una matriz MATRIGEL® 1:1. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 150-200 mm³, los ratones se asignaron aleatoriamente a los respectivos grupos de tratamiento y recibieron una única inyección intravenosa de vehículo, control de isotipo o 10 mg/kg de ADC. No hubo efectos adversos sobre el peso corporal en ninguno de los grupos de tratamiento durante el transcurso del estudio. Los efectos de **TF-ADC 6-4**, **TF-ADC 7-4**, **TF-ADC 6-8** y **TF-ADC 7-8** sobre la regresión y supresión del tumor se muestran en **las FIGURAS 10A-10F**.

EJEMPLO 7 – PK DE RATÓN

Se administraron TF-ADC 6-4, TF-ADC 6-8y el anticuerpo contra TF correspondiente (EXMA-006) a ratones desnudos BALB/c hembra (8-9 semanas) en una dosis única de 3 o 10 mg/kg mediante bolo intravenoso a un volumen de dosis de 5 ml/kg (es decir, con una concentración de dosificación de 0,6 mg/ml o 2 mg/ml). El día -1 del estudio, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento según el peso corporal.

TABLA E10.

Nombre de TA	Concentración inicial (mg/mL)	Cantidad (mg)
TF-ADC 6-4	10,58	5
TF-ADC 6-8	7,58	5
EXMA-006	32,1	5

Tras la inscripción, se inició el tratamiento y se continuó. Los pesos corporales se registraron después del reclutamiento (los días 1, 7, 14 y 21). Se recogieron muestras de sangre. Las concentraciones de anticuerpo total y ADC total se cuantificaron mediante ELISA. Los resultados correspondientes se grafican en la **FIGURA 11A**.

TABLA E11.

Día del estudio	Muestra Tipo	Proceso para	Anticoagulante	Volumen final	Gr/An	Condición de almacenamiento
Vea abajo	Sangre entera	Plasma	K2EDTA	110 µL de sangre entera 50 µL de plasma	Todas	-80 °C

TABLA E12.

Día	Grupo	Animal #	Punto(s) temporal(es)
0	Todas	1-3	15 minutos después de la dosis
0	Todas	4-6	4 h después de la dosis
1	Todas	7-9	24 h después de la dosis
3	Todas	1-3	72 h después de la dosis

Los días 7, 14 o 21 del estudio, los animales fueron anestesiados con isoflurano y sangrados hasta la exanguinación seguida de neumotórax bilateral. Se realizó toma de muestra de necropsia y recolección de datos.

TABLA E13.

Tipo	Proceso para	Anticoagulante	Gr/An	Volumen final	Condición de almacenamiento
Sangre entera, cardíaca	Plasma	K2EDTA	Todas	> 0,5 mL de sangre entera > 0,25 mL de plasma	-80 °C

Además, se realizó un segundo estudio para recolectar plasma de ratones desnudos BALB/c

hembra para el monitoreo farmacocinético (PK) en varios puntos de tiempo después de una dosis intravenosa única (IV) de **TF-ADC 6-4**, **TF-ADC 6-8**, un ADC de referencia (CAS 1418731-10-8 e INN 10148) y el anticuerpo contra TF correspondiente (**EXMA-006**).

El día -3 del estudio, los animales fueron asignados aleatoriamente según su peso corporal a grupos de tratamiento. El día 0 del estudio, los ratones recibieron una dosis intravenosa del ADC de referencia en dosis de 1, 3 o 10 mg/kg o de **TF-ADC 6-4**, **TF-ADC 6-8** o **EXMA-006** en dosis de 1 mg/kg. Se tomaron mediciones del peso corporal de los animales los días de estudio -3, 0, 7, 14 y 21. Se extrajo sangre retroorbital de los animales para obtener plasma 15 minutos después de la dosis (animales 1-3/grupo), 4 horas después de la dosis (animales 4-6/grupo), 24 horas después de la dosis (animales 7-9/grupo) y 72 horas después de la dosis (animales 1-3/grupo). Véase el **cuadro E12**. La sangre completa (110 µL/ratón por punto de tiempo) se procesó en plasma (K2EDTA, 50 µL/ratón por punto de tiempo). El plasma terminal se recolectó mediante extracción de sangre cardíaca el día 7 del estudio (animales 4-6/grupo), el día 14 (animales 7-9/grupo) o el día 21 (animales 1-3/grupo). La sangre completa (>0,5 ml/ratón) se procesó en plasma (K2EDTA, >0,25 ml/ratón). El estudio se completó con éxito, incluido el pesaje de los animales, la dosificación y la recolección de muestras biológicas. Las muestras de plasma se almacenaron congeladas a -80 °C hasta el momento de la prueba. Todos los animales sobrevivieron hasta los puntos de eliminación programados.

Se cuantificaron las concentraciones de anticuerpo total y ADC total. Los resultados correspondientes se grafican en la **FIGURA 11B**.

EJEMPLO 8 – ESTUDIO DE XENOINJERTO HPAF-II DE RESPUESTA A LA DOSIS

Las células tumorales HPAF-II (CVCL_0313) se mantuvieron *in vitro* con medio MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de NEAA y piruvato de sodio a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. Las células en fase de crecimiento exponencial fueron recolectadas y cuantificadas mediante un contador celular antes de la inoculación del tumor.

Se inocularon ratones BalbC/sin tratamiento hembras por vía subcutánea en la región del flanco superior derecho con 1x10⁷ células tumorales HPAF-II en 0,2 mL de PBS mezclado con MATRIGEL® (1:1) para el desarrollo del tumor. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 150-200 mm³, 88 ratones se asignaron aleatoriamente a los respectivos grupos de tratamiento (8 ratones en cada grupo) y recibieron una única inyección intravenosa de vehículo, control de isotipo o TF-ADC en las dosis indicadas en la siguiente tabla.

TABLA E14.

Grupo	Artículo de prueba	DAR	Dosis (mg/kg)
1	vehículo	-	-
2	Isotipo 2	8	10
3	TF-ADC 6-8	8	1
4		8	3

Grupo	Artículo de prueba	DAR	Dosis (mg/kg)
5		8	6
6		8	10
7	Isotipo 1	4	10
8	TF-ADC 6-4	4	1
9		4	3
10		4	6
11		4	10

Después de la inoculación de células tumorales, los animales se controlaron a diario para determinar la morbilidad y la mortalidad. Durante el monitoreo de rutina, se examinó a los animales para detectar cualquier efecto del crecimiento del tumor y los tratamientos sobre el comportamiento, tales como la movilidad, el consumo de agua y alimentos, el aumento/pérdida de peso corporal (los pesos corporales se midieron dos veces por semana después de la aleatorización), los enredos en el pelo/ojos y cualquier otra anomalía. La mortalidad y los signos clínicos observados se registraron en detalle para animales individuales.

Los volúmenes de los tumores se midieron dos veces por semana después de la asignación aleatoria en dos dimensiones mediante el uso de un calibrador, y el volumen se expresó en mm³ mediante el uso de la fórmula: $V = (L \times W \times W)/2$, donde V es el volumen tumoral, L es la longitud del tumor (la dimensión más larga del tumor) y W es el ancho del tumor (la dimensión más larga del tumor perpendicular a L). La dosificación, así como las mediciones del peso corporal y del tumor se realizaron en una cabina de flujo laminar.

Los pesos corporales y los volúmenes de los tumores se midieron mediante el uso del software StudyDirector™ (versión 3.1.399.19). El estudio concluyó cuando el volumen tumoral medio del grupo de control de vehículo alcanzó 2000 mm³ o 6 semanas después de la dosis final, lo que ocurriera primero.

Se usó la prueba de Bartlett para verificar el supuesto de homogeneidad de la varianza en todos los grupos.

Los efectos de **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 6-8** sobre la regresión y supresión tumoral en el modelo de xenoinjerto HPAF-II se muestran en **las FIGS. 12A y 12B**. En particular, estos ADC DAR4 y DAR8 demostraron una supresión tumoral relacionada con la dosis y una inhibición máxima comparable en el modelo de xenoinjerto HPAF-II.

EJEMPLO 9 – ESTUDIO DE TOXICIDAD DE NHP

Para evaluar la toxicidad de los TF-ADC, se trataron monos cynomolgus («cyno») hembras (n= 2 por grupo) mediante bolo intravenoso con artículos de prueba en las dosis indicadas en la tabla a continuación los días 1 y 22 (q3wX2). Todos los monos que sobrevivieron hasta el día 43 del estudio fueron sometidos a eutanasia para necropsia y evaluación de patología anatómica. Se realizaron observaciones clínicas, ECG, exámenes oculares, patología clínica y anatómica y

análisis de TK.

TABLA E15.

Grupo n.º	Artículo de prueba	DAR	Animal #	Dosis (mg/kg)
1	Control de vehículo	--	2	--
2	TF-ADC 6-4	4	2	5
3		4	2	10
4		4	2	20
5		4	2	40
6		4	2	60
7	TF-ADC 6-8	8	2	5
8		8	2	10
9		8	2	20
10		8	2	40

Se evaluaron las concentraciones de los anticuerpos y los ADC completos de **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 6-8** ADC en plasma de cyno y los datos se muestran en las **FIGURAS 13A y 13B**. Este resultado muestra que los perfiles de concentración-tiempo de anticuerpos totales y ADC son comparables para ambos ADC analizados. Este resultado indica además que **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 6-8** fueron tolerados hasta las dosis más altas analizadas de 60 mg/kg y 40 mg/kg, respectivamente, cuando se administraron a NHP (cyno) en un programa q3wX2. Además, la concentración sérica de ADC y de anticuerpos totales aumentó más que la proporcional a la dosis. No se observó acumulación y, en el caso de dosis bajas, la relación de acumulación fue <1 , lo que sugiere un posible impacto de los anticuerpos antidrogas (ADA). La vida media terminal osciló entre 1,8 y 3,77 días para **TF-ADC 6-4** y entre 1,96 y 2,85 días para **TF-ADC 6-8**, similar al TF ADC descrito en WO2021003399, donde la vida media osciló entre 2,07 y 3,47 días.

Además, se evaluaron las concentraciones de carga activa en el plasma de cyno tratados con varias dosis de **TF-ADC 6-4** y **TF-ADC 6-8** y los datos se muestran en las **FIGS. 14A y 14B**. Este resultado indica que un nivel bajo de concentración de carga activa para ambos ADC sugirió una desconjugación mínima del fármaco del anticuerpo in vivo. El nivel plasmático de belotecan fue bajo en relación con los ADC y el anticuerpo total, con una relación molar (AUC_{0-21d}) que osciló entre 169 y 519 para **TF-ADC 6-4** y entre 130 y 156 para **TF-ADC 6-8**. El TF-ADC 6-4 tenía aproximadamente el doble de belotecan en comparación con el **TF-ADC 6-8** para el mismo nivel de dosis. Se observó una acumulación mínima de carga activa. La vida media aparente de Belotecan osciló entre 3 y 6 días (velocidad de formación limitada).

EJEMPLO 10 – ACTIVACIÓN INMUNITARIA

La muerte celular inmunogénica inducida por el tratamiento (ICD) puede estimular respuestas inmunitarias antitumorales que refuerzan los efectos terapéuticos (Fucikova et al. Cell Death Dis. 2020 Nov 26;11(11):1013). En consecuencia, se evaluó más a fondo el **TF-ADC 6-8** por sus efectos sobre la activación inmunitaria, por ejemplo, ICD, activación de células inmunitarias (células mieloides y T) y liberación de citocinas.

Tratamiento de células tumorales: Las células tumorales (como A431 o SKOV-3) se tripsinizaron lavándolas con PBS, luego se agregaron 3 ml de TrypLE express a cada matraz T75 y se incubaron durante 3-5 minutos a 37 °C. Se añadió DMEM que contenía 10 % FBS (Gibco) a cada matraz para lavar suavemente las células. Luego, las células se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugaron a 1000 RPM durante 5 minutos y se resuspendieron en medio nuevo. Se contaron las células y la concentración celular se ajustó a 10.000 células por 80 µL. Las células se sembraron a razón de 80 µL por pocillo y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 5 horas para permitir que las células se adhirieran a la superficie de la placa. Se realizaron diluciones 5x de los compuestos de tratamiento en el medio. Se agregó 20 µL de tratamiento a cada pocillo y se mezclaron suavemente y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂. También se probaron en paralelo belotecan, MMAE y un ADC de referencia (también denominado en este documento BM ADC, CAS 1418731-10-8 e INN 10148) y sirvieron como controles adicionales.

Las lecturas de moléculas ICD, como ATP y HMGB1, se realizaron de la siguiente manera. Para medir la liberación de ATP, se utilizó el kit de ensayo de ATP extracelular Promega RealTimeGlo (Promega, Cat# GA5010) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron utilizando medio Leibovitz L15 sin CO₂(Gibco). La liberación de ATP se midió comenzando 24 horas después del tratamiento con lecturas cada 10 minutos en un Spectramax i3x con control de temperatura a 37 °C. Para medir la liberación de HMGB1, se utilizó el kit de ensayo Lumit HMGB1 (Promega, Cat# W6110) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La liberación de HMGB1 se midió 48 y 72 horas después del tratamiento.

Se proporcionan resultados ejemplares de liberación de ATP en **las FIGS. 15A-15C (FIGS. 15A y 15B, A431; FIG. 15C, SKOV3)**, mientras que **la FIG. 16** representa gráficamente la HMGB1 liberada por las células tumorales A431 tratadas. **Las FIGURAS 15B y 15C** proporcionan el área bajo la curva (AUC) de los resultados de la liberación de ATP de las células tumorales tratadas con varias concentraciones de **TF-ADC 6-8**, control de isotipo (un anticuerpo IgG1 de isotipo conjugado con belotecán), o belotecán, mientras que la **FIGURA 15A** y la **FIGURA 16** representan gráficamente las AUC en los grupos de tratamiento de control (un anticuerpo IgG1 de isotipo conjugado con belotecán), 33 nM **TF-ADC 6-8**, 33 nM belotecán, 100 nM MMAE, o 100 nM ADC de referencia.

Estos resultados mostraron que **TF-ADC 6-8** o belotecan indujeron la liberación de moléculas inmunoestimulantes, como HMGB1 y ATP, en la línea de células tumorales TF+, *por ejemplo*, A431; y las células tumorales tratadas **con TF-ADC 6-8** liberaron niveles más altos de

ATP durante 24 horas.

Cocultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC): después de 48 horas de tratamiento con células tumorales, las PBMC humanas congeladas se descongelaron en un medio precalentado (RPMI con 10 % FBS, HEPES, Glutamax, NEAA y PenStrep). Las células se centrifugaron a 1000 RPM durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en PBS con Cell Trace Violet (CTV 1:6000) durante 15 minutos a 37 °C. Se añadió un volumen equivalente de medio y se incubó durante otros 5 minutos para neutralizar la tinción de violeta de trazas celulares. Las células se centrifugaron y se resuspendieron a 1×10^6 células/mL. Se agregó 40 U/mL de IL2 para mantener la viabilidad celular. Para el tratamiento combinado de MMAE libre, se agregó un anticuerpo anti-PD1 (también denominado en la presente aPD1, número CAS 1374853-91-4) a 50 nM. Se agregó 50 µL de PBMC (50.000 células) a cada pocillo y se cocultivaron durante 24 a 96 horas y se analizaron mediante citometría de flujo. También se recogieron sobrenadantes de 24 a 96 horas para el análisis de producción de citocinas.

Análisis de producción de citocinas: para la producción de citocinas de activación inmunitaria, se solicitó un kit UPLEX personalizado a Meso Scale Discovery para medir MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, IFN γ y TNF α . Los sobrenadantes se probaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leyeron en un instrumento Meso QuickPlex y se analizaron en el software Discovery Workbench.

Los resultados se proporcionan en **las FIGS. 17A-20B**, indicando que el tratamiento **con TF-ADC 6-8** de células tumorales que expresan TF puede causar muerte celular inmunogénica (ICD) que puede activar las células inmunes para inducir la producción de citocinas inflamatorias.

Aunque la presente invención se ha descrito en referencia a las modalidades específicas de esta, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer diversos cambios y los equivalentes se pueden sustituir sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas de proceso particulares, al objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Todas estas modificaciones pretenden estar comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.