

**MOLÉCULA ENLAZADOR-FÁRMACO Y CONJUGADO ANTICUERPO-FÁRMACO, SU MÉTODO
DE PREPARACIÓN Y USO**

CAMPO TÉCNICO

5

La presente invención se refiere al campo biomédico, en particular a un método para preparar una molécula conjugado de anticuerpo-fármaco y uso del mismo.

REFERENCIA CRUZADA

10

Esta solicitud reclama la prioridad de PCT/CN2023/106385 presentada el 7 de julio de 2023, cuyo contenido se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

DOCUMENTO DE LISTADO DE SECUENCIAS SOMETIDO SIMULTÁNEAMENTE

15

El contenido del archivo XML adjunto se incorpora en la presente para referencia en su totalidad: listado de secuencia en formato legible en computadora (CRF) (nombre del archivo: TFH01015PCT-sequence listing.xml, fecha: 29 de mayo de 2024, tamaño: 6KB)

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25

Mediante la conjugación de un compuesto farmacológico biológicamente activo con un anticuerpo, proteína, o polipéptido dirigido a un tumor, se puede aumentar la ventana de tratamiento del cáncer de los compuestos farmacológicos. Esto se logra principalmente a través de dos aspectos: en primer lugar, el conjugado de fármaco no puede producir efectos secundarios tóxicos antes de alcanzar la lesión objetivo del cáncer debido a la incapacidad del fármaco activo para desprenderse suavemente; en segundo lugar, el fármaco activo puede aumentar la concentración del compuesto del fármaco en la lesión objetivo del cáncer a través de la conjugación del anticuerpo, proteína, o polipéptido objetivo con el fármaco activo, debido a que un enlazador especialmente diseñado puede ser activado por el entorno especial de la lesión objetivo del cáncer para romper y con ello liberar el compuesto farmacológico activo.

30

35

Los segmentos de péptido de aminoácidos especialmente diseñados sensibles a las proteasas de tejido en el enlazador pueden ser escindidos eficientemente por las proteasas de tejido en los lisosomas de las células cancerosas. Un compuesto farmacológico se conecta al segmento de péptido de aminoácidos del enlazador a través de un grupo químico autoinmolante, después de que

el polipéptido es escindido por la proteasa de tejido, el grupo químico autoinmolante libera compuestos farmacológicos libres a través del "efecto autoinmolante", dando como resultado un efecto de eliminación de tumores. Entre ellos, destacan los datos de validación clínica y los correspondientes fármacos aprobados obtenidos a partir de los conjugados de anticuerpo- o polipéptido-fármaco en la forma de enlazadores de péptido (VC, VA, AAA, etc.)-PAB (grupo autoinmolante). Sin embargo, debido a las fuertes características lipófilas de los compuestos farmacológicos, especialmente aquellos con un importante efecto de muerte de células espectadora sobre los tumores, los conjugados de anticuerpo, proteína o polipéptido-fármaco, especialmente cuando la relación fármaco a anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) es alta, exhiben propiedades farmacológicas deficientes y baja hidrofiliidad, formando así polímeros y acelerando la eliminación in vivo. Al agregar un grupo hidrófilo tal como polietilenglicol (PEG) (Mol Cancer Ther, 2017, 16(1): 116-123; Nat. Biotech. 2015, 33:733-735, Toxicol. App. Pharmacol., 2020, 392: 114932; WO2023280227), polylysine (PSAR) (Chem. Sci, 2019, 10(14): 4048-4053; WO 2022228493), alcohol de azúcar (Cancer Res (2018) 78 (13_Supplement): 755; US 9907854) en el enlazador para enmascarar compuestos farmacológicos, la formación de fármacos conjugados de anticuerpos, proteínas o péptido-fármaco se mejorará hasta cierto punto. Sin embargo, el uso de polímeros de PEG para modificar proteínas ha expuesto muchas desventajas en la práctica clínica, tal como una alta proporción de pacientes que exhiben inmunogenicidad anti-PEG y efectos secundarios tóxicos relacionados, y una modificación excesiva que conduce a función de proteína disminuida.

20

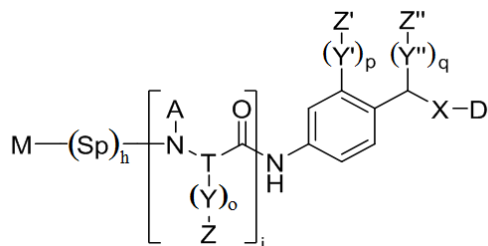
BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Con base en esto, esta solicitud introduce una fuerte cadena lateral hidrófila de sal interna de sulfonato y/o sal interna de fosfato (a veces referida como el enlazador o los enlazadores de sal interna de esta solicitud, es decir, un compuesto representado por la Fórmula (1) como se describe más adelante) en la posición del polipéptido (VC, VA, AAA, etc.)-PAB (grupo autoinmolante) del enlazador. Como tanto el grupo sulfonato como el grupo fosfato tienen un donante y un aceptor de enlaces de hidrógeno, pertenecen a un grupo hidrófilo fuerte, y la sal interna de sulfonato o la sal interna de fosfato tiene ambas cargas positivas y negativas, lo que mejora aún más la hidrofiliidad. Al mismo tiempo, los grupos funcionales solubles en agua en la forma de sales internas también tienen el potencial de mejorar la focalización del tumor y reducir la unión no específica del conjugado anticuerpo-fármaco, mejorando así en gran medida la formación de fármaco (incluyendo hidrofiliidad y estabilidad) del conjugado de anticuerpo-fármaco probado, reduciendo la eliminación del fármaco in vivo, y mejorando la eficacia del tratamiento tumoral.

35

Las soluciones técnicas de esta solicitud son como a continuación:

1. Un compuesto representado por la Fórmula (1), o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la Fórmula (1) tiene la siguiente fórmula estructural:



Fórmula (1)

M es un espaciador; Sp es -L_a-Q_a-; A se selecciona de ausente, hidrógeno o alquilo; T representa un grupo alquilo trivalente (1 a 8 átomos de carbono) lineal o ramificado; Y, Y' e Y'' son cada uno independientemente -L_b-Q_b-; L_a y L_b son cada uno independientemente seleccionados de grupo ausente, alquileno, alquenileno, alquinileno, alicicileno, heteroalícicileno, arileno, heteroarileno o polietilenglicol, en donde el grupo alquileno, alquenileno, alquinileno, alicicileno, heteroalícicileno, arileno, heteroarileno o polietilenglicol está opcionalmente sustituido por un sustituyente;

Q_a y Q_b son cada uno independientemente seleccionados de ausente, -C(=O)NR-, -C(=O)O-, -OC(=O)NR-, -S(=O)₂NR-, -NRC(=O)-, -OC(=O)-, -NRC(=O)O-, -NRS(=O)₂-, -NRC(=O)NR-, -NHC(=NH)NH-, -C(=O)-, -OC(=O)O-, -O-, -NR-, -S-, S(=O)₂-, S(=O)-, o -Se-, en donde R se selecciona de hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido;

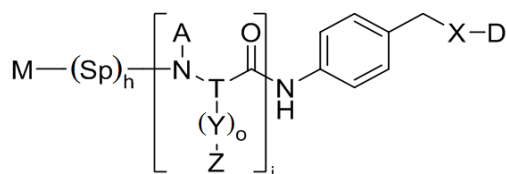
Z se selecciona de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido o una sal interna de sulfonato;

Z', y Z'' son cada uno independientemente seleccionados de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato;

Al menos uno de Z, Z' y Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato;

X comprende una unidad autoinmoladora o está ausente; D comprende una molécula de fármaco; i es un número entero igual a o mayor que 1; h es un número entero de 1 a 6; o, p y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5.

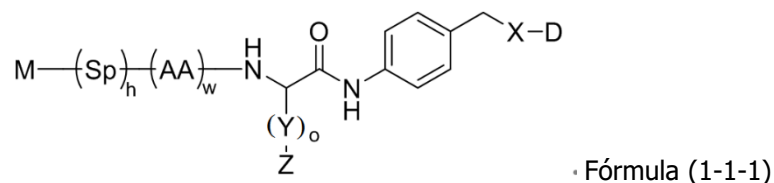
2. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 1, en donde la Fórmula (1) es la Fórmula (1-1):



Fórmula (1-1)

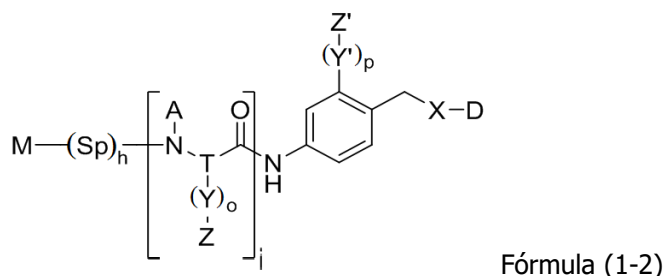
en donde M, Sp, A, T, Y, h, o, i, X, D, y Z son como se definen en el punto 1;
al menos uno de los i Zs es una sal interna de sulfonato.

3. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 2, en donde la Fórmula (1-1) es la Fórmula (1-1-1):



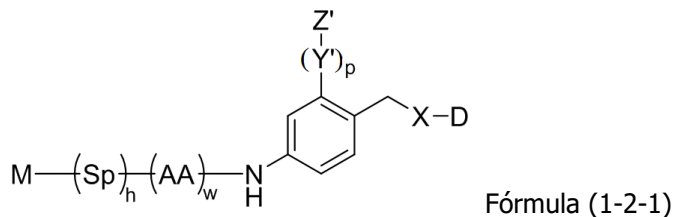
en donde AA es un residuo de aminoácido, W es un número entero igual a o mayor que 1.

4. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 1, en donde la Fórmula (1) es la Fórmula (1-2):



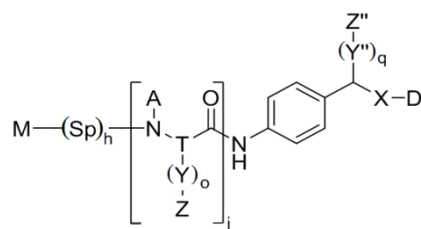
en donde M, Sp, A, T, Y, Z, o, p, i, h, X, Y', y D son como se definen en el punto 1;
Z' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

5. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 4, en donde la Fórmula (1) es la Fórmula (1-2-1):



en donde AA es un residuo de aminoácido, W es un número entero igual a o mayor que 1.

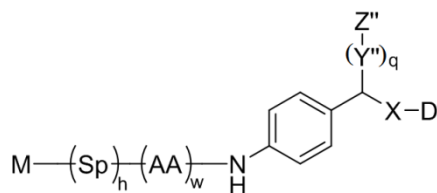
6. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 1, en donde la Fórmula (1) es la Fórmula (1-3):



Fórmula (1-3)

en donde M, Sp, A, Y, T, Z, o, i, h, q, X, Y'', y D son como se definen en el punto 1; Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

7. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 6, en donde la Fórmula (1) es la Fórmula (1-3-1):



Fórmula (1-3-1)

en donde AA es un residuo de aminoácido, W es un número entero igual a o mayor que 1.

8. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde cuando A y Z están ausentes, N, Y y T forman un anillo para tener una fórmula estructural de:



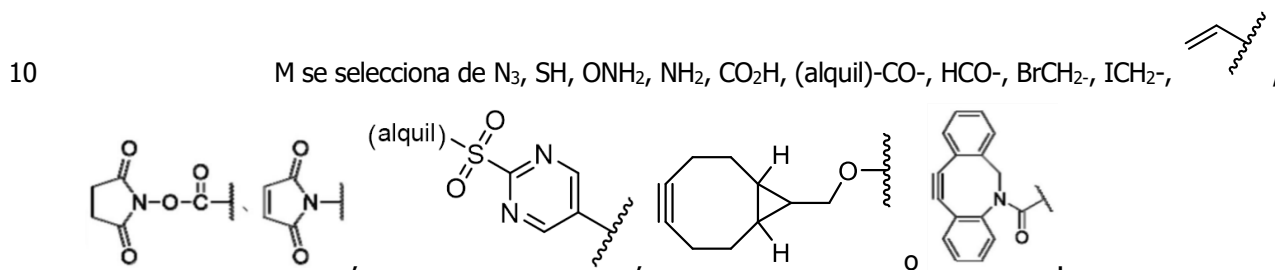
9. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 3, 5 y 7, en donde el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina.

10. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 3, 5 y 7, en donde el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: valina, ácido glutámico, citrulina, lisina, alanina,

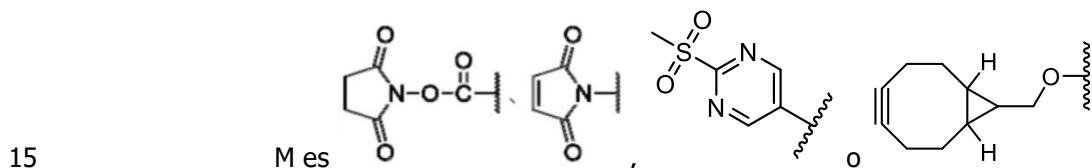
fenilalanina, arginina, glutamina, asparagina, y glicina.

11. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 3, 5 y 7, en donde el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: valina, citrulina, alanina, fenilalanina, glutamina, y glicina.

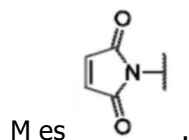
12. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 11, en donde



13. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 12, en donde



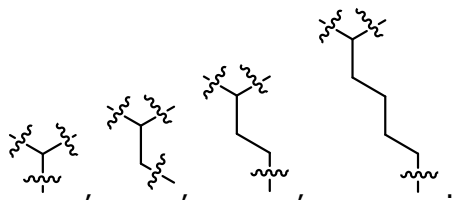
14. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 13, en donde



- 20 15. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 14, en donde A es hidrógeno, metilo, etilo o propilo.

- 25 16. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 15, en donde A es hidrógeno.

17. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 16, en donde el T es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:



5

18. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del



mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 17, en donde el T es .

19. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 18, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquilenilo, alquenileno, alquinileno, alicicilileno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo, heteroalícicilileno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo y 1 a 4 heteroátomos, arileno con 6 a 18 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarileno con 6 a 18 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquilenilo, alquenileno, alquinileno, alicicilileno, heteroalícicilileno, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

20. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 19, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquilenilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquenileno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alquinileno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alicicilileno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo, heteroalícicilileno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo y 1 a 4 heteroátomos, o arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarileno con 6 a 10 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquilenilo, alquenileno, alquinileno, alicicilileno, heteroalícicilileno, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

21. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

5 mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 20, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, alquilenilo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, alquinileo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquilenilo, o alquinileo está

22. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 21, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; y en donde el grupo polietilenglicol es $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, o $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, y n es un número entero igual a o mayor que 1.

23. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 22, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: etilideno, propilideno lineal, butilideno lineal, pentilideno lineal, y $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$; y en donde n es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

24. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 23, en donde L_a es etilideno y/o $-(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2-$ o pentilideno.

25. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 24, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo, alquilenilo, alquinileo, alicicileno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo, heteroalicicileno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo y 1 a 4 heteroátomos, arileno con 6 a 18 átomos de carbono en uno o más anillos, o heteroarileno con 6 a 18 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquilenilo, alquinileo, alicicileno, heteroalicicileno, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

26. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 25, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono,

alquenileno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alquinileno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alicicileno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo, heteroalícicileno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo y 1 a 4 heteroátomos, o arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarileno con 6 a 10 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquenileno, alquinileno, alicicileno, heteroalícicileno, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

27. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 26, en donde L_b se selecciona de alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, alquenileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o alquinileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o grupo polietilenglicol;

el grupo polietilenglicol es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, y $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$; n es un número entero igual a o mayor que 1; y el alquileo, alquenileno, o alquinileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente.

28. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 27, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y arileno de 6 a 10 átomos de carbono.

29. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 28, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: metileno, etileno, *n*-propilideno, isopropilideno, *n*-butilideno, isobutilideno, *sec*-butilideno, *terc*-butilideno, y bencilideno.

30. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 29, en donde Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)NR-$, $-NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRC(=O)NR-$, $NHC(=NH)NH-$, $-C(=O)-$, y $-OC(=O)O-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

31. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo de conformidad con el punto 30, en donde Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-C(=O)NR-$, $-NRC(=O)NR-$, $-OC(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$ y $-OC(=O)-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

5 32. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 30, en donde Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-NRC(=O)-$, y $-(C=O)NR-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

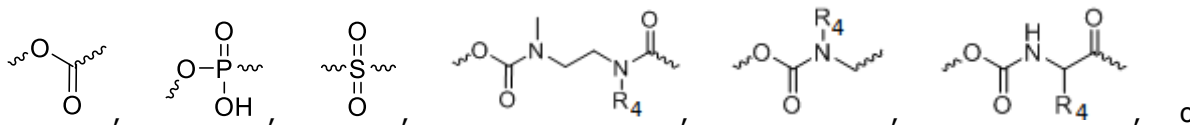
10 33. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 30, en donde Q_a es $-C(=O)-$, $-N(CH_3)-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)-NH-$ o $-C(=O)-N(CH_3)-$.

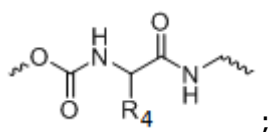
15 34. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 33, en donde Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRC(=O)NR-$, $NHC(=NH)NH-$, $-C(=O)-$, y $-OC(=O)O-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

20 35. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 34, en donde Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-C(=O)NR-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, y $-NRC(=O)NR-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

25 36. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 34, en donde Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)NR-$, y $-C(=O)NR-$; R es hidrógeno o metilo.

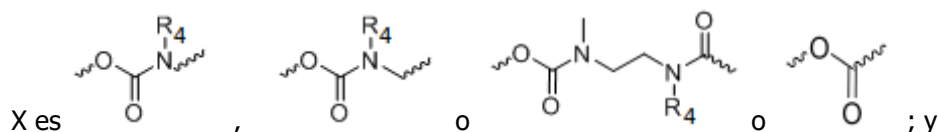
30 37. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 36, en donde X se selecciona de:





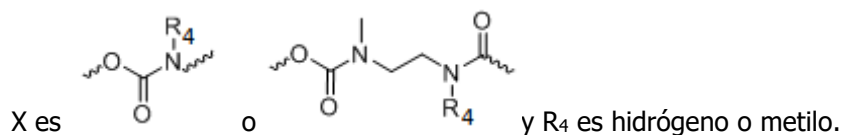
- la línea ondulada en el lado derecho de X está conectada a D; R₄ se selecciona de hidrógeno, alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{R}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2\text{R}_3$, o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}_2$; R₂, y R₃ son cada uno independientemente seleccionados de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono; y m es un número entero mayor que 1.

38. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 37, en donde

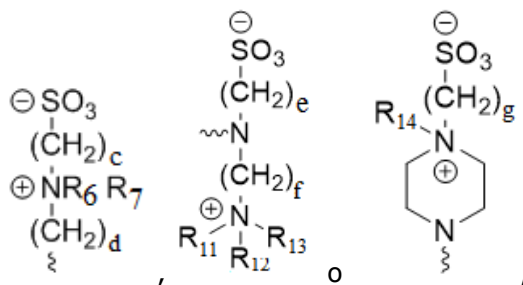


- R₄ es hidrógeno, metilo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$, o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$.

39. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 37, en donde



40. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 39, en donde la sal interna de sulfonato es

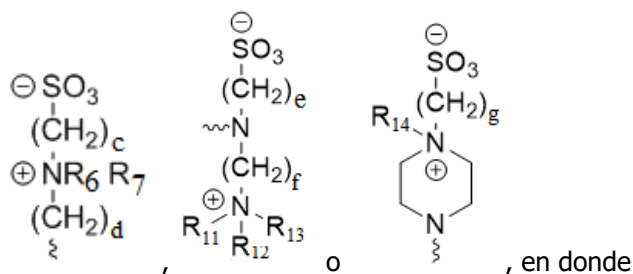


- la línea ondulada está conectada a Y, Y' o Y''; en donde c, d, e, f, y g son cada uno independientemente un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y

R₆, R₇, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ son cada uno independientemente seleccionados de ausente, hidrógeno, alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

41. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

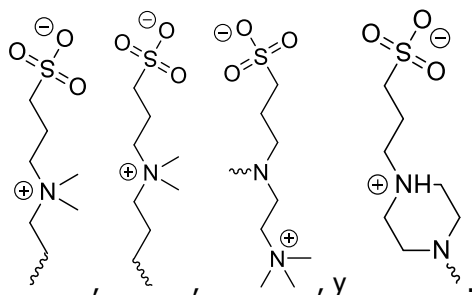
mismo de conformidad con el punto 40, en donde la sal interna de sulfonato es



$R_6, R_7, R_{11}, R_{12}, R_{13}$ y R_{14} son cada uno independientemente seleccionados de ausente, metilo o etilo; y

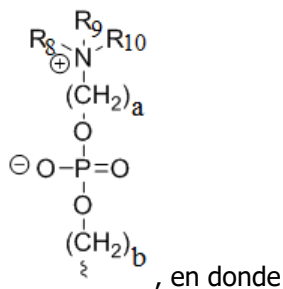
5 $c, d, e, f,$ y g son cada uno independientemente 1, 2, o 3.

42. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 40, en donde la sal interna de sulfonato es cualquiera seleccionada del grupo que consiste en:



10

43. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 42, en donde la sal interna de fosfato es

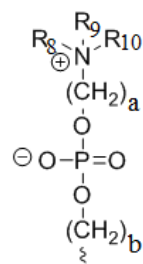


15 a y b son cada uno independientemente un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y R_8, R_9 y R_{10} son cada uno independientemente seleccionados de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

44. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 43, en donde

20

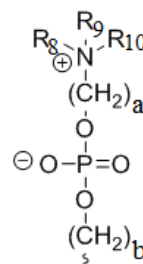
la sal interna de fosfato es



, en donde R_8 , R_9 , y R_{10} son cada uno independientemente metilo o etilo; a es 1, 2, o 3; y b es 1, 2, o 3.

45. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 43, en donde

la sal interna de fosfato es



, en donde R_8 , R_9 , y R_{10} son cada uno independientemente metilo; a es 2; y b es 1.

46. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 45, en donde el D comprende una citotoxina o agonista inmunológico.

47. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 46, en donde la citotoxina es una o dos seleccionadas del grupo que consiste en: un inhibidor de microtubulina, un inhibidor de síntesis de ADN, un inhibidor de topoisomerasa, y un inhibidor de ARN polimerasa-2.

48. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 46, en donde la citotoxina es una, dos, o más seleccionadas del grupo que consiste en: auristatina, mertansina DM, caliqueamicina, duocarmicina, pirrolobenzodiazepina, derivado de camptotecina, y α -amanitina.

49. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo de conformidad con el punto 46, en donde el agonista inmunológico se selecciona de agonista de TLR7/8 o agonista de STING.

50. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 49, en donde i es 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8.

51. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 50, en donde h es 1, 2, 3, o 4.

52. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 51, en donde o, p, y q son cada uno independientemente 0, 1, 2 o 3.

53. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 52, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; el grupo polietilenglicol es $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, o $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, n es un número entero igual a o mayor que 1; Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-NR(C=O)-$, y $-(C=O)NR-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

54. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 53, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: etilideno, propilideno lineal, butilideno lineal, pentilideno lineal, y $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$; en donde n es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-NR(C=O)-$, y $-(C=O)NR-$; y en donde R es metilo y/o hidrógeno.

55. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 53, en donde L_a es etilideno y/o $-(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2-$ o pentilideno; y Q_a es $-C(=O)-$, $-N(CH_3)-$, $-NH(C=O)-$, $-C(=O)NH-$ o $-C(=O)-N(CH_3)-$.

56. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 55, en donde L_b se selecciona de alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, alquilenilo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de

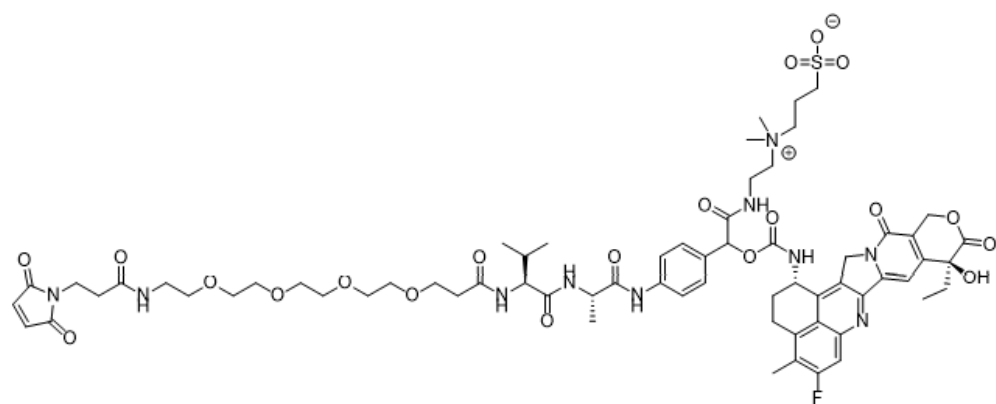
carbono, o alquilenilo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, o grupo polietilenglicol; el grupo polietilenglicol es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, y $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$; n es un número entero igual a o mayor que 1; el alquilenilo, alquilenilo, o alquilenilo está opcionalmente sustituido por un sustituyente; Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRS(=O)_2-$, $-NRC(=O)NR-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)O-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

57. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 56, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquilenilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y arileno de 6 a 10 átomos de carbono; Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-C(=O)NR-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, y $-NRC(=O)NR-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

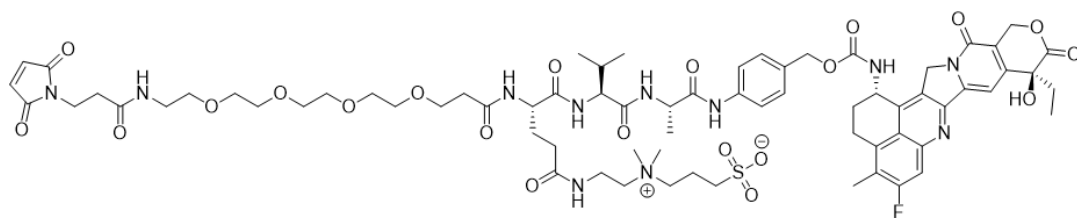
58. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 56, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: metileno, etileno, n-propilideno, isopropilideno, n-butilideno, isobutilideno, sec-butilideno, terc-butilideno, y bencilideno; Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)NR-$, y $-C(=O)NR-$; y R es hidrógeno o metilo.

59. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 58, en donde el sustituyente es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en: deuterio, tritio, halógeno, amino, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo opcionalmente sustituido, alquilenilo, alquilenilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, acilo, amino opcionalmente sustituido, aminoformilo opcionalmente sustituido, tioaminoformilo opcionalmente sustituido, sulfamina opcionalmente sustituida, hidroxilo opcionalmente sustituido, tioalquilo opcionalmente sustituido (SH), y sililo opcionalmente sustituido.

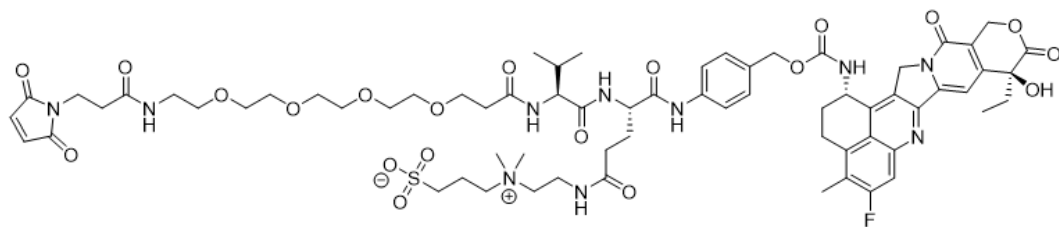
60. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 59, en donde el compuesto es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:



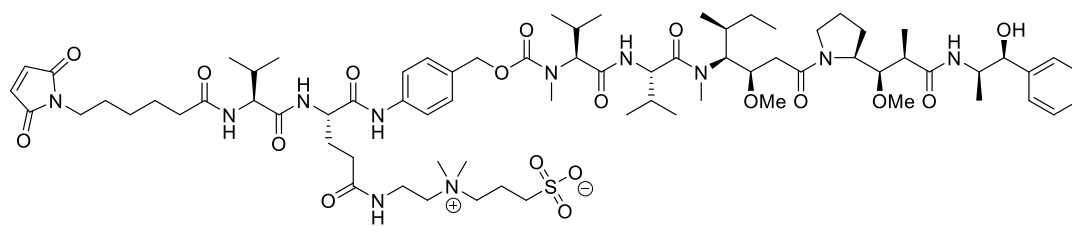
LD-31,



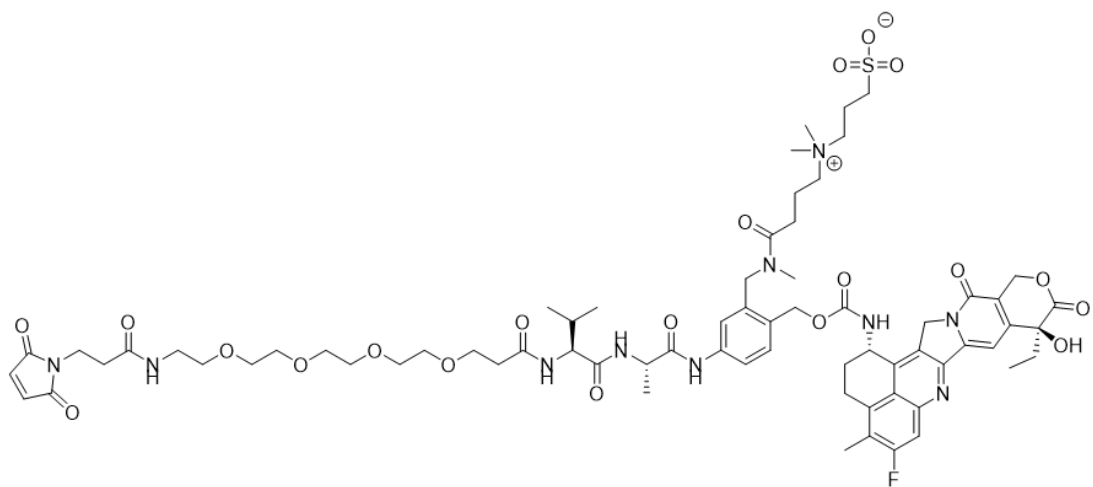
LD-37,



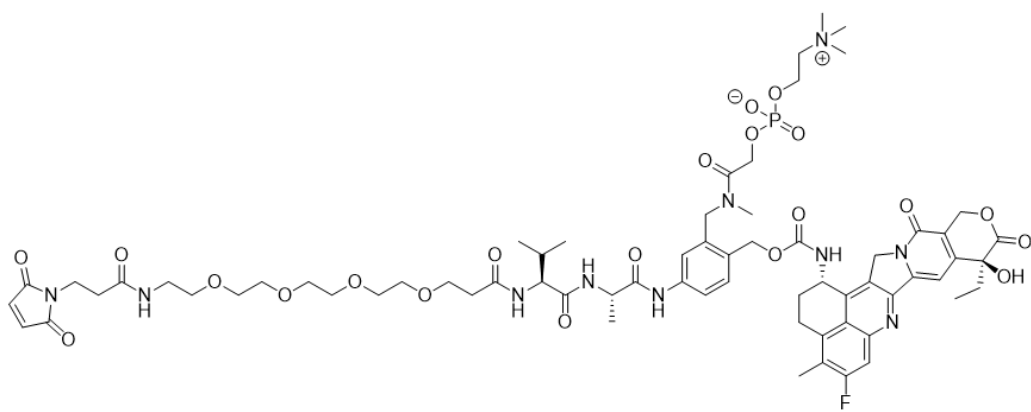
LD-38,



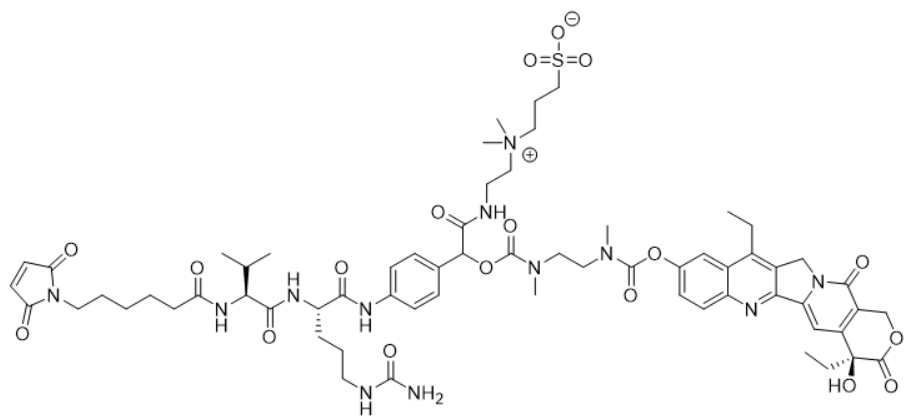
LD-57,



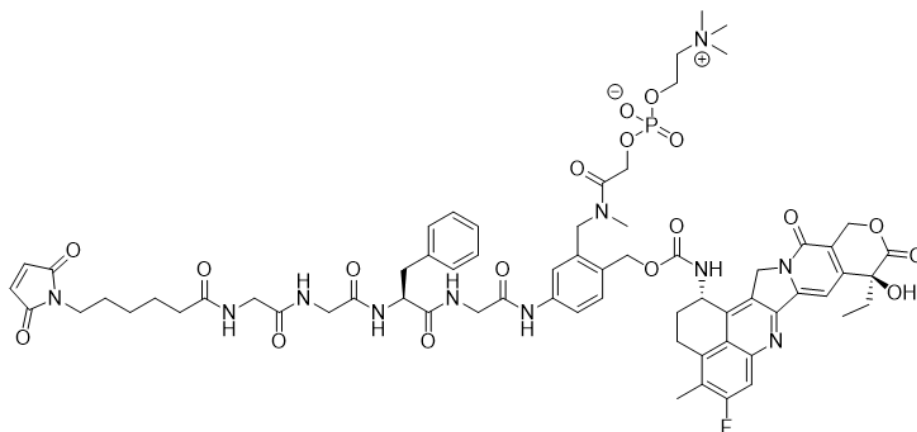
LD-65,



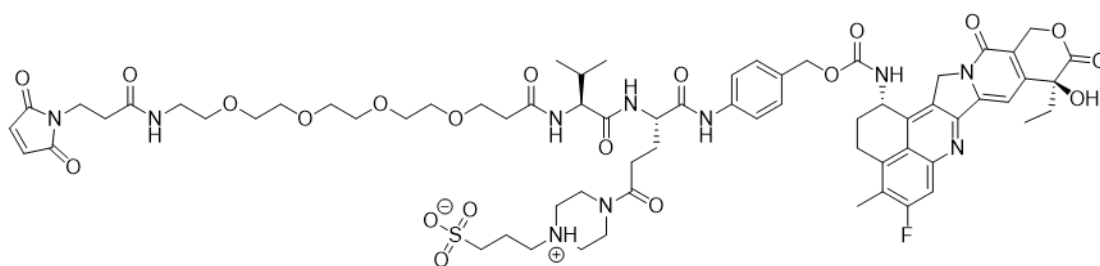
LD-66,



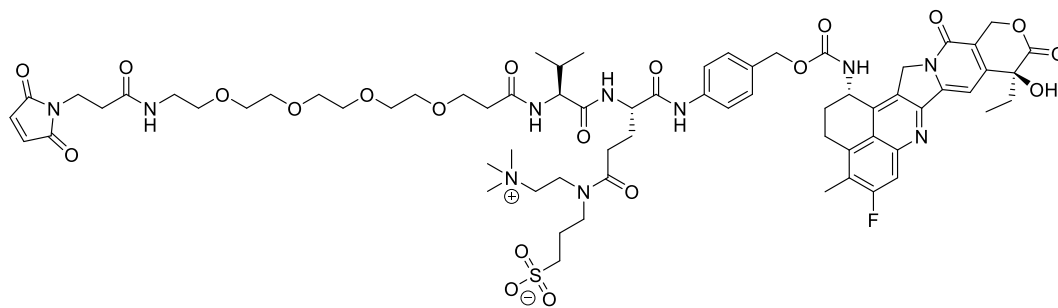
LD-71,



LD-72,

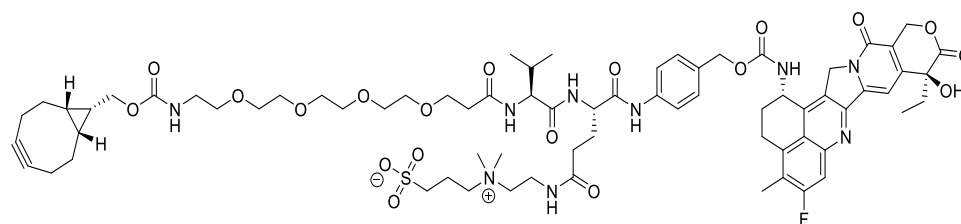


LD-88,



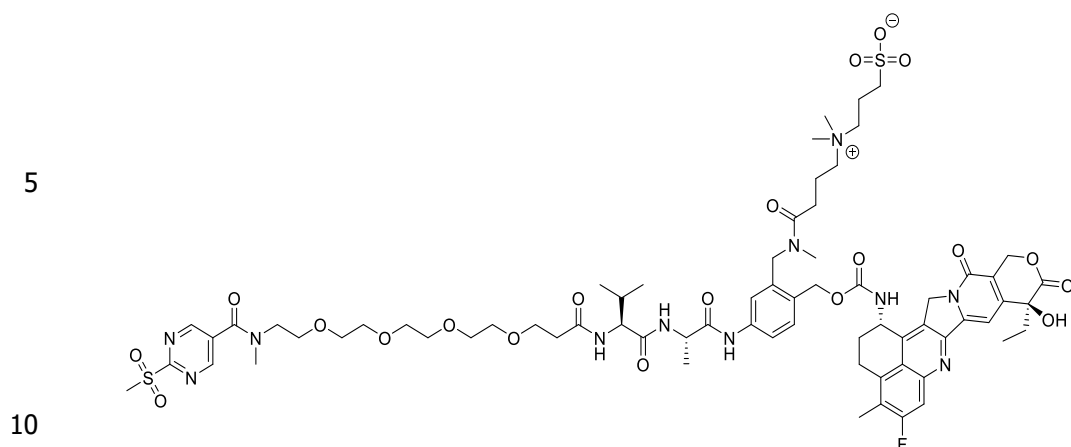
LD-89

5

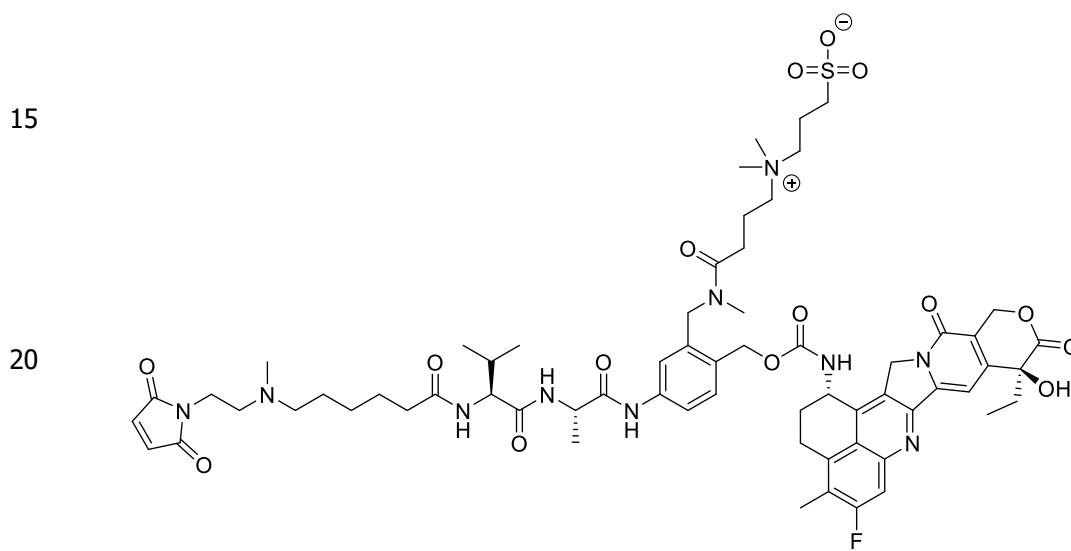


10

LD-94

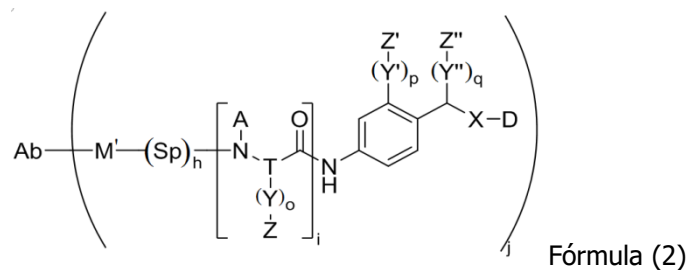


LD-98 y



LD-99.

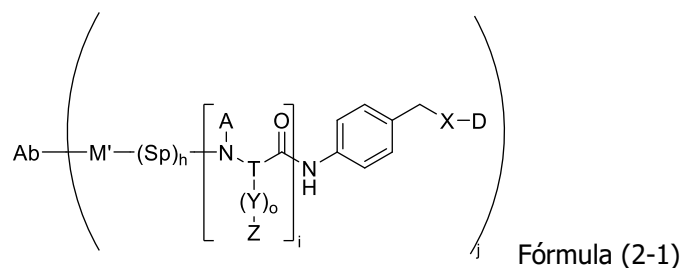
- 25
61. Un compuesto representado por la Fórmula (2), o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la Fórmula (2) tiene la siguiente fórmula estructural:



Ab comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; M' es un espaciador; Sp es -La-Qa-; A se selecciona de ausente, hidrógeno o alquilo; T representa un grupo

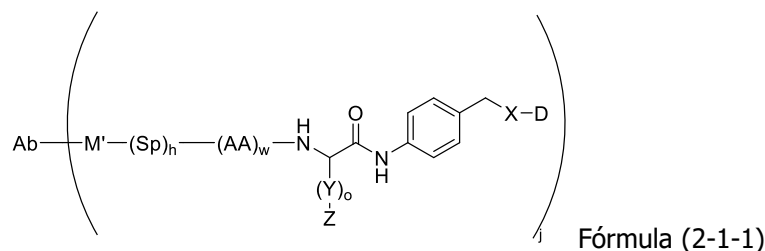
alquilo trivalente (1 a 8 átomos de carbono) lineal o ramificado; Y, Y' e Y'' son cada uno independientemente -L_b-Q_b-; L_a y L_b son cada uno independientemente seleccionados de grupo ausente, alquileo, alquenileno, alquinileno, alicicileno, heteroalícicileno, arileno, heteroarileno o polietilenglicol, en donde el grupo alquileo, alquenileno, alquinileno, alicicileno, heteroalícicileno, arileno, heteroarileno o polietilenglicol está opcionalmente sustituido por un sustituyente; Q_a, y Q_b son cada uno independientemente seleccionados de ausente, -C(=O)NR-, -C(=O)O-, -OC(=O)NR-, -S(=O)₂NR-, -NRC(=O)-, -OC(=O)-, -NRC(=O)O-, -NRS(=O)₂-, -NRC(=O)NR-, -NHC(=NH)NH-, -C(=O)-, -OC(=O)O-, -O-, -NR-, -S-, S(=O)₂-, S(=O)-, o -Se-; en donde R se selecciona de hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido; Z se selecciona de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido o una sal interna de sulfonato; Z' y Z'' son cada uno independientemente seleccionados de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato; al menos uno de Z, Z' y Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato; X comprende una unidad autoinmoladora o está ausente; D comprende una molécula de fármaco; i es un número entero igual a o mayor que 1; h es un número entero de 1 a 6; o, p, y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5; y j es un número entero igual a o mayor que 1.

62. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 61, en donde la Fórmula (2) es la Fórmula (2-1):



en donde Ab, M', Sp, A, T, Y, h, o, i, j, X, D, y Z son como se definen en el punto 61; al menos uno de los i Zs es una sal interna de sulfonato.

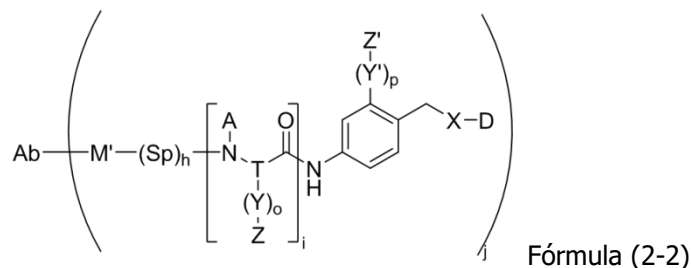
63. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 62, en donde la Fórmula (2-1) es la Fórmula (2-1-1):



en donde AA es un residuo de aminoácido, W es un número entero igual a o mayor

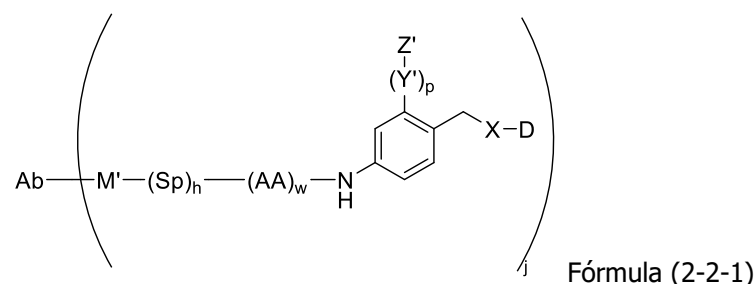
que 1.

64. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 61, en donde la Fórmula (2) es la Fórmula (2-2):



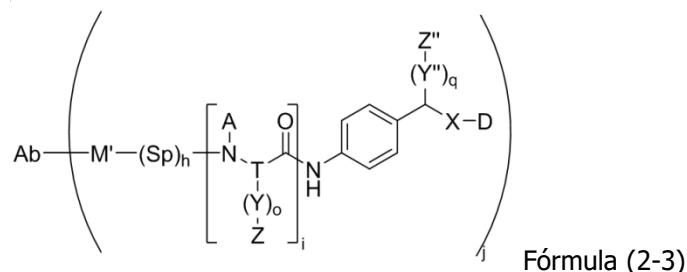
en donde Ab, M', Sp, A, T, Y, Z, o, p, i, h, j, X, Y', y D son como se definen en el punto 61; y Z' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

65. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 64, en donde la Fórmula (2-2) es la Fórmula (2-2-1):



en donde AA es un residuo de aminoácido, W es un número entero igual a o mayor que 1.

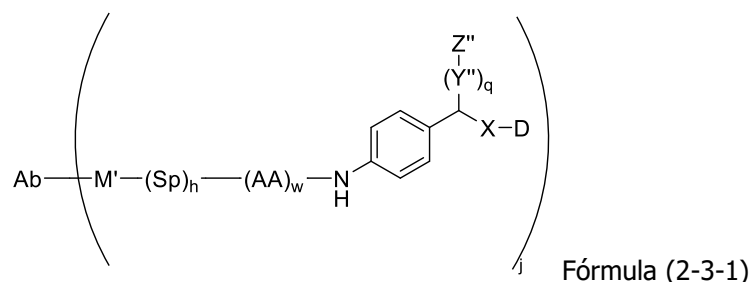
66. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 61, en donde la Fórmula (2) es la Fórmula (2-3):



en donde Ab, M', Sp, A, Y, T, Z, o, i, h, j, q, X, Y'', y D son como se definen en el punto 61; Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

67. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero

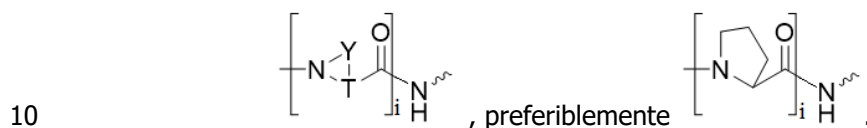
del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 66, en donde la Fórmula (2-3) es la Fórmula (2-3-1):



en donde AA es un residuo de aminoácido, y W es un número entero igual a o mayor

5 que 1.

68. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 67, en donde cuando A y Z están ausentes, N, Y y T forman un anillo para tener una fórmula estructural de:



69. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 63, 65 o 67, en donde el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina.

15

70. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 63, 65 o 67, en donde el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: valina, ácido glutámico, citrulina, lisina, alanina, fenilalanina, arginina, glutamina, asparagina, y glicina.

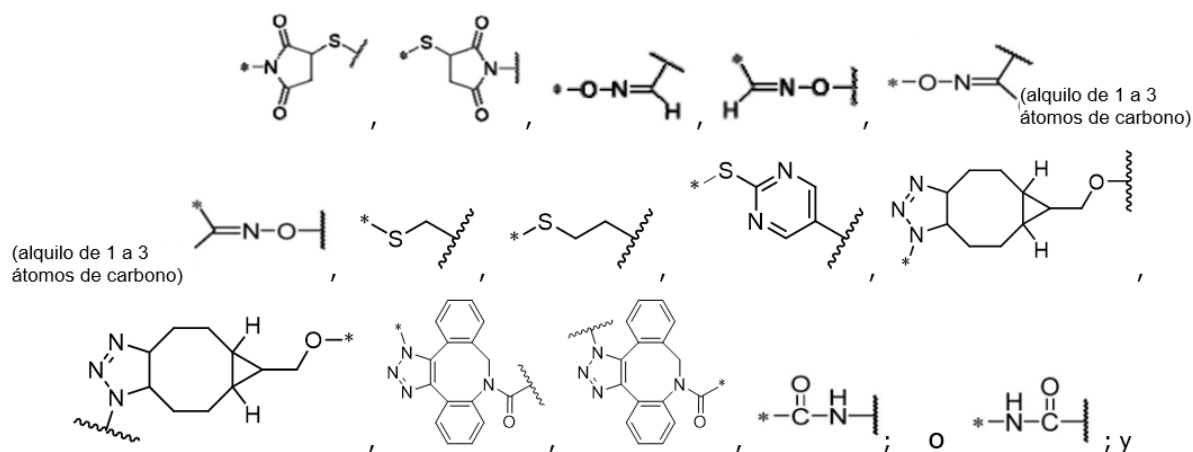
20

71. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 63, 65 o 67, en donde el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: valina, citrulina, alanina, fenilalanina, glutamina, y glicina.

25

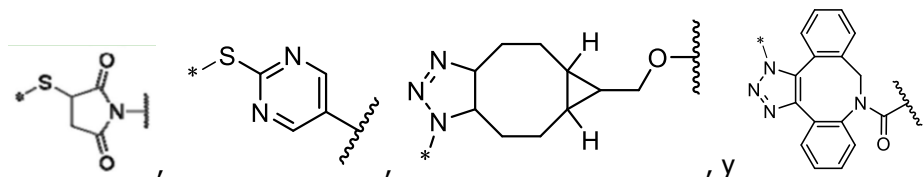
72. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 71, en donde M' es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:

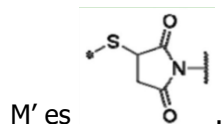


* está conectado a Ab.

- 5 73. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 72, en donde M' es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:



- 10 74. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 73, en donde

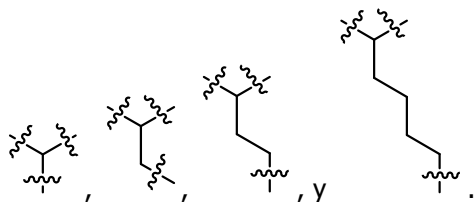


75. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 74, en donde A es hidrógeno, metilo, etilo o propilo.

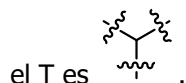
76. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 75, en donde A es hidrógeno.

77. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 76, en donde el T es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:



78. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 77, en donde



79. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 78, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, aliciclicilenilo saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo, heteroalíciclicilenilo saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo y 1 a 4 heteroátomos, arilenilo con 6 a 18 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarilenilo con 6 a 18 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, aliciclicilenilo, heteroalíciclicilenilo, arilenilo, o heteroarilenilo está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

80. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 79, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquilenilo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquenilenilo lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alquinilenilo lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, aliciclicilenilo saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo, heteroalíciclicilenilo saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo y 1 a 4 heteroátomos, o arilenilo con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarilenilo con 6 a 10 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, aliciclicilenilo, heteroalíciclicilenilo, arilenilo, o heteroarilenilo está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

81. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 80, en donde L_a es uno, dos, tres o más

seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, alquienilo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o alquiniilo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquienilo, o alquiniilo está opcionalmente sustituido por un sustituyente.

5 82. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 81, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol;

10 el grupo polietilenglicol es $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, o $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, y n es un número entero igual a o mayor que 1.

15 83. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 82, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: etilideno, propilideno lineal, butilideno lineal, pentilideno lineal, y $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$; y en donde n es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

20 84. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 83, en donde L_a es etilideno y/o $-(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2-$ o pentilideno.

25 85. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 84, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo, alquienilo, alquiniilo, alicicileno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo, heteroalicicileno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo y 1 a 4 heteroátomos, arileno con 6 a 18 átomos de carbono en uno o más anillos, o heteroarileno con 6 a 18 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquienilo, alquiniilo, alicicileno, heteroalicicileno, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

30

35 86. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 85, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono,

alquenileno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alquinileno lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alicicileno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo, heteroalícicileno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo y 1 a 4 heteroátomos, o arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarileno con 6 a 10 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquenileno, alquinileno, alicicileno, heteroalícicileno, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

87. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 86, en donde L_b se selecciona de alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, alquenileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o alquinileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o grupo polietilenglicol; el grupo polietilenglicol es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, y $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$; n es un número entero igual a o mayor que 1; y el alquileo, alquenileno, o alquinileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente.

88. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 87, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y arileno de 6 a 10 átomos de carbono.

89. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 88, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: metileno, etileno, n-propilideno, isopropilideno, n-butilideno, isobutilideno, sec-butilideno, terc-butilideno, y bencilideno.

90. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 89, en donde Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)NR-$, $-NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRC(=O)NR-$, $NHC(=NH)NH-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)O-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

91. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo de conformidad con el punto 90, en donde

5 Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-C(=O)NR-$, $-NRC(=O)NR-$, $-OC(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$ o $-OC(=O)-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

10 92. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 90, en donde Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-NRC(=O)-$ y $-(C=O)NR-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

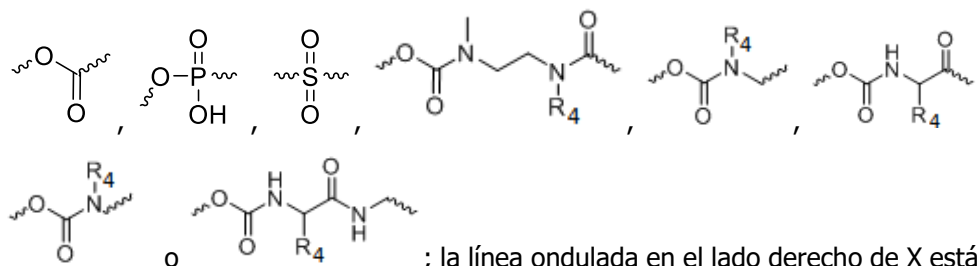
93. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 90, en donde Q_a es $-C(=O)-$, $-N(CH_3)-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)-NH-$ o $-C(=O)-N(CH_3)-$.

15 94. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 93, en donde Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRC(=O)NR-$, $NHC(=NH)NH-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)O-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

25 95. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 94, en donde Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-C(=O)NR-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, o $-NRC(=O)NR-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

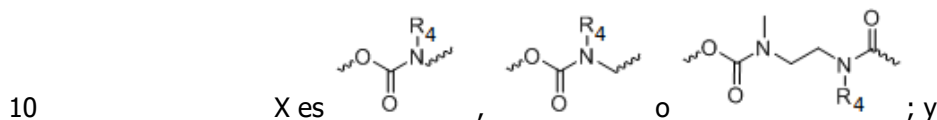
30 96. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 94, en donde Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)NR-$, y $-C(=O)NR-$; y R es hidrógeno o metilo.

97. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 96, en donde X se selecciona de:



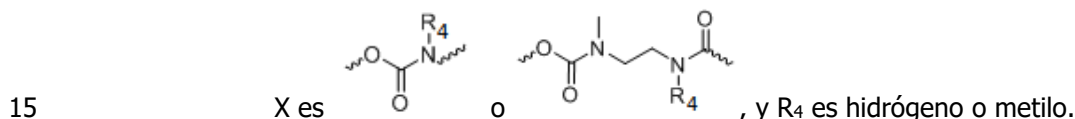
- 5 ; la línea ondulada en el lado derecho de X está conectada a D; R_4 se selecciona de hidrógeno, alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, $-(CH_2CH_2O)_mR_2$, $-CH_2CH_2NR_2R_3$, o $-CH_2CH_2SO_2R_2$; R_2 , y R_3 son cada uno independientemente seleccionados de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono; y m es un número entero mayor que 1.

98. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 97, en donde

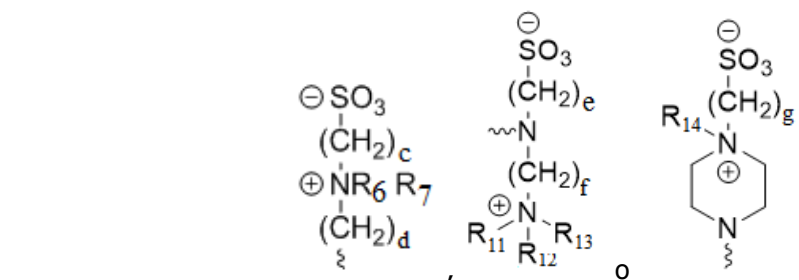


R_4 es hidrógeno, metilo, $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2NMe_2$, o $-CH_2CH_2SO_2Me$.

99. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 97, en donde



100. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 99, en donde la sal interna de sulfonato es



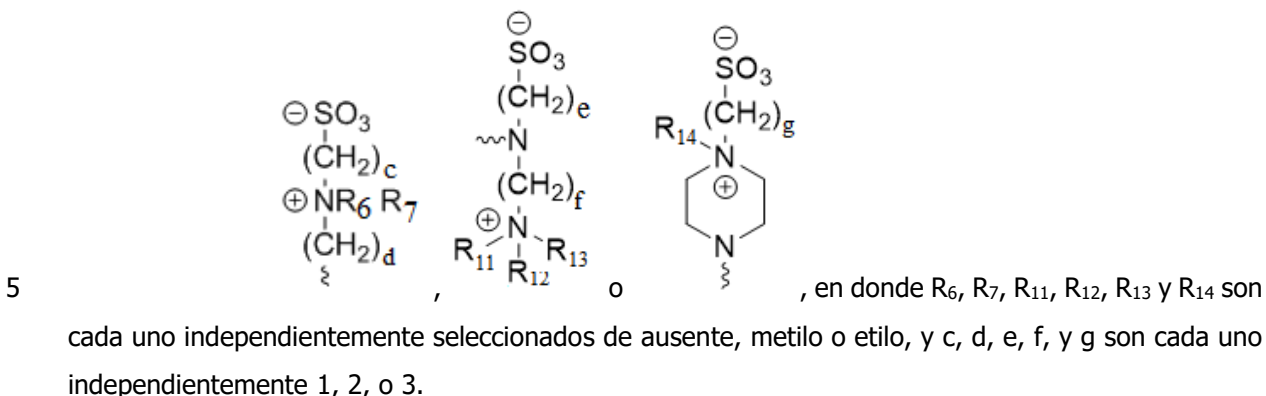
la línea ondulada está conectada a Y, Y' o Y'';

en donde c, d, e, f, y g son cada uno independientemente un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y

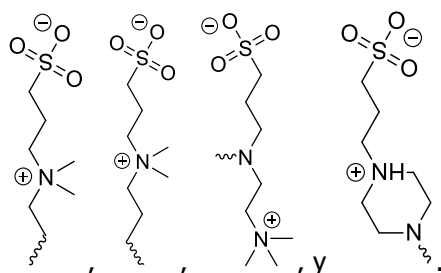
R_6 , R_7 , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} son cada uno independientemente seleccionados de ausente,

hidrógeno, alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

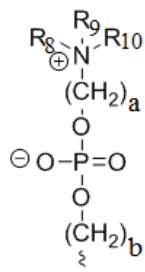
101. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 100, en donde la sal interna de sulfonato es



102. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 100, en donde la sal interna de sulfonato es cualquiera seleccionada del grupo que consiste en:

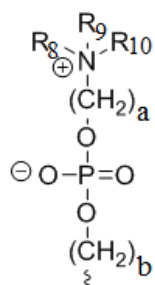


103. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 102, en donde la sal interna de fosfato es



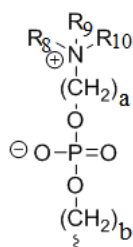
104. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo de conformidad con el punto 103, en donde la sal interna de fosfato es



, en donde R₈, R₉, y R₁₀ son cada uno independientemente metilo o etilo; a es 1, 2, o 3; y b es 1, 2, o 3.

105. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 103, en donde la sal interna de fosfato es



, en donde R₈, R₉, y R₁₀ son cada uno independientemente metilo; a es 2; y b es 1.

106. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 105, en donde el D comprende una citotoxina o agonista inmunológico.

107. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 106, en donde la citotoxina es uno o dos seleccionados del grupo que consiste en: un inhibidor de microtubulina, un inhibidor de síntesis de ADN, un inhibidor de topoisomerasa, y un inhibidor de ARN polimerasa-2.

108. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 106, en donde la citotoxina es uno, dos, o más seleccionados del grupo que consiste en: auristatina, mertansina DM, caliqueamicina, duocarmicina, pirrolobenzodiazepina, derivado de camptotecina, y α-amanitina.

109. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 106, en donde el agonista inmunológico se selecciona de agonista

de TLR7/8 o agonista de STING.

110. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 109, en donde i es 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8.

5 111. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 110, en donde h es 1, 2, 3, o 4.

112. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 111, en donde o, p, y q son cada uno independientemente 0, 1, 2 o 3.

113. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 112, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; el grupo polietilenglicol es $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, o $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, n es un número entero igual a o mayor que 1; Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR(C=O)-$, y $-(C=O)NR-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

114. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 113, en donde L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: etilideno, propilideno lineal, butilideno lineal, pentilideno lineal, y $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$; en donde n es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-NR(C=O)-$, y $-(C=O)NR-$; y en donde R es metilo y/o hidrógeno.

115. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 114, en donde L_a es etilideno y/o $-(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2-$ o pentilideno; y Q_a es $-C(=O)-$, $-N(CH_3)-$, $-NH(C=O)-$, $-C(=O)NH-$ o $-C(=O)-N(CH_3)-$.

116. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 115, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono,

alquenileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o alquinileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, o grupo polietilenglicol; el grupo polietilenglicol es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, y $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$; n es un número entero igual a o mayor que 1; el alquileo, alquenileno, o alquinileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRS(=O)_2-$, $-NRC(=O)NR-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)O-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

117. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 116, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y arileno de 6 a 10 átomos de carbono; Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-C(=O)NR-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, y $-NRC(=O)NR-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

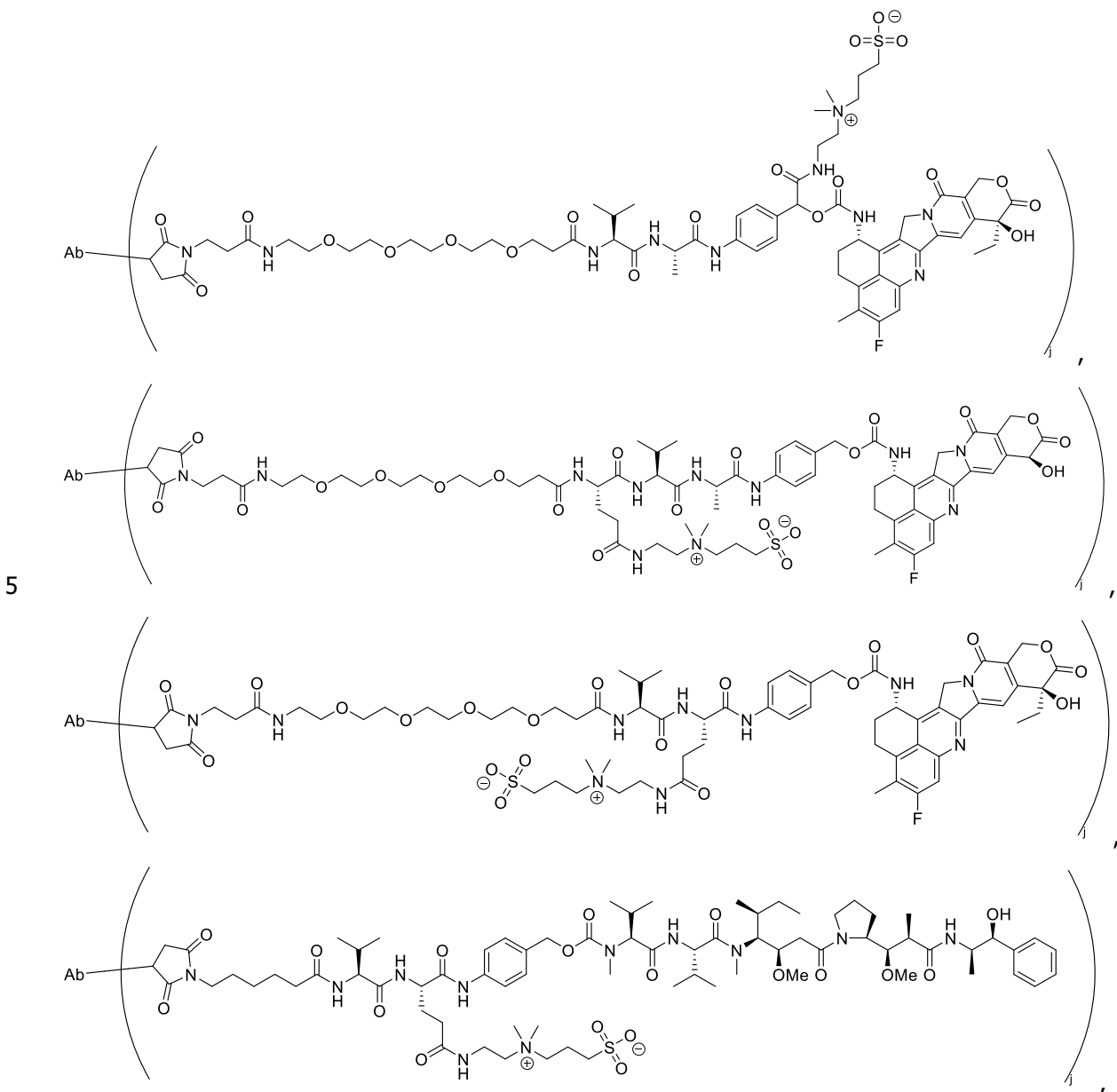
118. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con el punto 116, en donde L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: metileno, etileno, n-propilideno, isopropilideno, n-butilideno, isobutilideno, sec-butilideno, terc-butilideno, y bencilideno; Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)NR-$, y $-C(=O)NR-$; y R es hidrógeno o metilo.

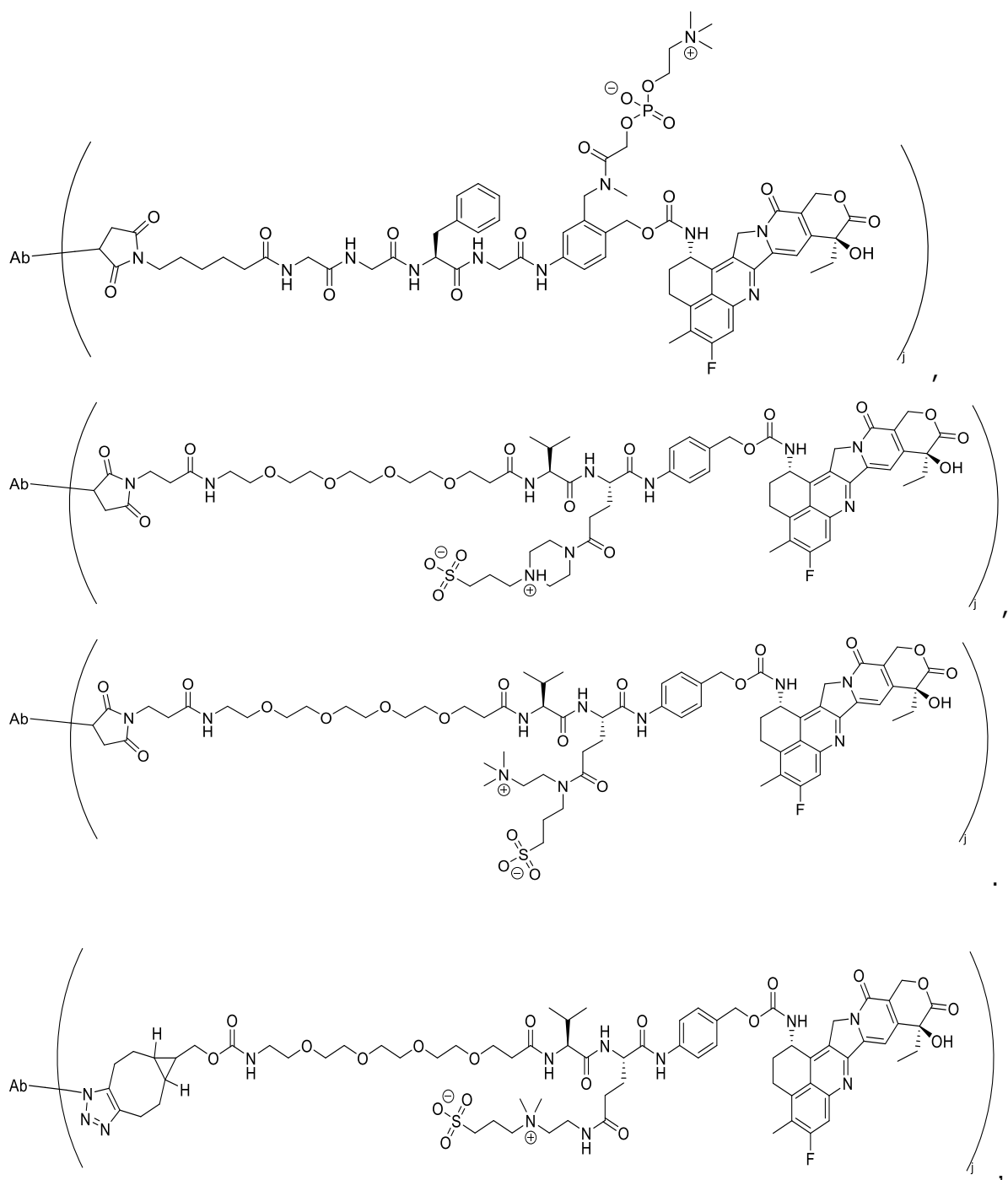
119. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 118, en donde el sustituyente es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en: deuterio, tritio, halógeno, amino, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo opcionalmente sustituido, alqueniilo, alquinilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, acilo, amino opcionalmente sustituido, aminoformilo opcionalmente sustituido, tioaminoformilo opcionalmente sustituido, sulfamina opcionalmente sustituida, hidroxilos opcionalmente sustituidos, tioalquilo opcionalmente sustituido (SH), y sililo opcionalmente sustituido.

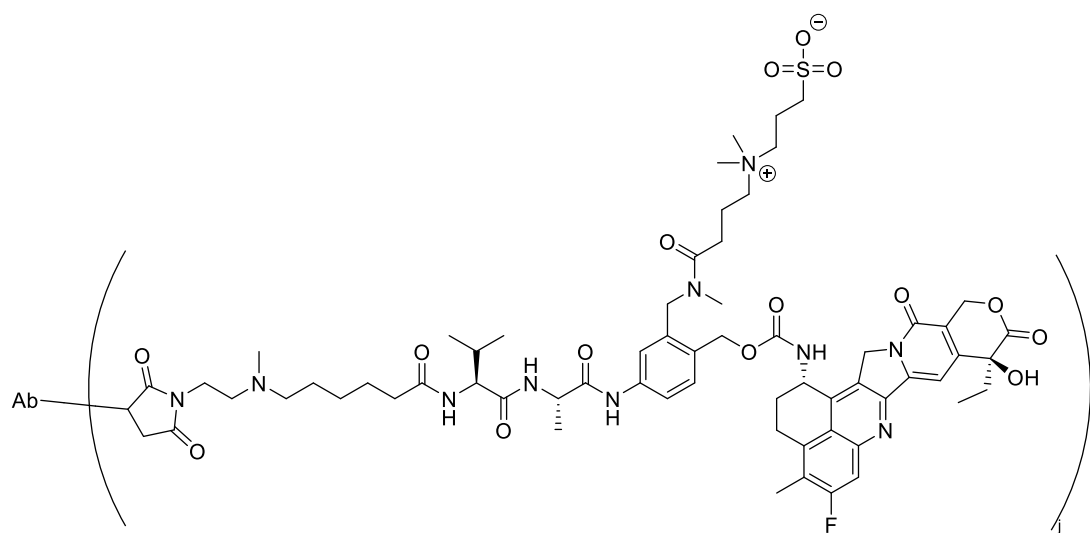
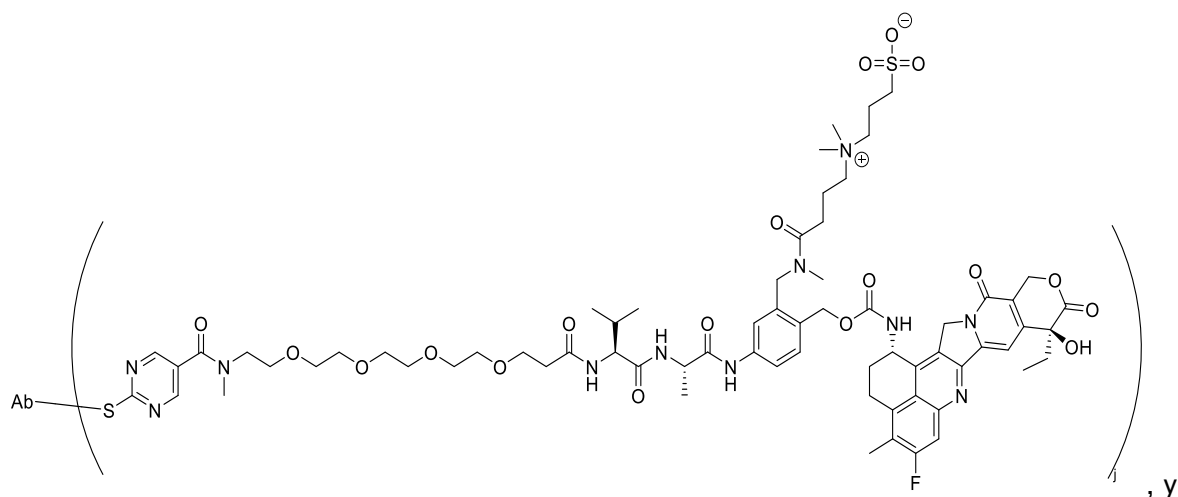
120. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 119, en donde j es un número entero de 1 a 20.

121. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero

del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 120, en donde el compuesto es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:







122. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 121, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo derivado de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo completamente humano.

123. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 122, en donde el anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal.

124. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 123, en donde el anticuerpo comprende un

anticuerpo biespecífico.

125. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 124, en donde el fragmento de unión a
5 antígeno se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', fragmento de Fv, F(ab')₂, F(ab)₂, scFv, di-scFv y VHH.

126. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 125, en donde el Ab se selecciona del grupo
10 que consiste en: un anticuerpo anti-Claudin18.2, un anticuerpo anti-receptor de folato humano, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-HER3, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-GPC20, un anticuerpo anti-CDH6, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-AXL, un anticuerpo anti-nectina-4, un anticuerpo anti-factor de tejido, un anticuerpo anti-TIM-1, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-EpCAM, un anticuerpo anti-MUC1,
15 un anticuerpo anti-STEAP1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-FGF2, un anticuerpo anti-FOLR1, un anticuerpo anti-c-MET, un anticuerpo anti-GFR, un anti-AGS-16, un anticuerpo anti-guanilil ciclase C, un anticuerpo anti-mesotelina, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-AGS-5, un anticuerpo anti-GPC-3, un anticuerpo anti-c-KIT, un anticuerpo anti-ROR1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CD27L, un anticuerpo anti-5T4, un anticuerpo anti-
20 Mucina 16, un anticuerpo anti-NaPi2b, un anticuerpo anti-STEAP, un anticuerpo anti-SLITRK6, un anticuerpo anti-ETBR, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEACAM5, un anticuerpo anti-SC-16, un anticuerpo anti-SLC39A6, un anticuerpo anti-proteína 3 similar a Delta, un anticuerpo anti-Claudin18.2, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD37, un anticuerpo anti-CD45, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD66e, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD73, un anticuerpo anti-CD74, un anticuerpo anti-CD79b, un anticuerpo anti-CD138, un anticuerpo anti-CD147, un anticuerpo anti-CD166, un anticuerpo anti-CD223, un anticuerpo anti-MUC16, un anticuerpo anti-MSLN, un anticuerpo anti-ENPP3, un anticuerpo anti-SLTRK6, un anticuerpo anti-FGFR, un anticuerpo anti-LIV-1, un anticuerpo anti-Lewis Y, un anticuerpo anti-integrina av, un anticuerpo anti-
30 ASCT2, un anticuerpo anti-C4.4a, un anticuerpo anti-CA-IX, un anticuerpo anti-CD324, un anticuerpo anti-CD352, un anticuerpo anti-CD44v6, un anticuerpo anti-CD48a, un anticuerpo anti-CLL-1, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-DPEP3, un anticuerpo anti-efrina-A2, un anticuerpo anti-efrina-A4, un anticuerpo anti-ETBR, un anticuerpo anti-FGFR2, un anticuerpo anti-FGFR3, un anticuerpo anti-FLT3, un anticuerpo anti-GD3, un anticuerpo anti-GloboH, un anticuerpo anti-GPC3, un anticuerpo anti-LAMP-1, un anticuerpo anti-LRRC15, un anticuerpo anti-Ly6E,
35

un anticuerpo anti-MFI2, un anticuerpo anti-NOTCH3, un anticuerpo anti-p-cadherina, un anticuerpo anti-PRLR y un anticuerpo anti-RNF43, y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos anteriores.

127. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 126, en donde la cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del Ab comprenden la cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo, respectivamente.

128. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 127, en donde la región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) del Ab comprenden la región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo, respectivamente.

129. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 128, en donde la cadena pesada y cadena ligera del Ab comprenden la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo, respectivamente.

130. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 129, en donde el Ab es un anticuerpo anti-Claudin18.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

131. El compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 61 a 130, en donde el Ab es un anticuerpo anti-receptor de folato humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

132. Una composición farmacéutica, que comprende el compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 131.

133. Uso del compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo de conformidad con cualquiera de los puntos 1 a 131 en la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir un tumor.

134. El uso de conformidad con el punto 133, en donde el tumor es un tumor asociado con un objetivo seleccionado del grupo que consiste en: Claudin18.2, receptor de folato humano, HER2, HER3, TROP2, B7-H3, GPC20, CDH6, EGFR, EGFRvIII, AXL, Nectina-4, factor de tejido, TIM-1,

PSMA, EpCAM, MUC1, STEAP1, GPNMB, FGF2, FOLR1, c-MET, GFR, AGS-16, Guanilil ciclasa C, Mesotelina, SLC44A4, EphA2, AGS-5, GPC-3, c-KIT, ROR1, PD-L1, CD27L, 5T4, Mucina 16, NaPi2b, STEAP, SLITRK6, ETBR, BCMA, CEACAM5, SC-16, SLC39A6, proteína 3 similar a delta, Claudin18.2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD45, CD56, CD66e, CD70, CD73, CD74, CD79b, CD138, CD147, CD166, CD223, MUC16, MSLN, ENPP3, SLTRK6, FGFR, LIV-1, Lewis Y, integrina av, ASCT2, C4.4a, CA-IX, CD324, CD352, CD44v6, CD48a, CLL-1, Cripto, CS1, DPEP3, Efrina-A2, Efrina-A4, ETBR, FGFR2, FGFR3, FLT3, GD3, Globo H, GPC3, LAMP-1, LRRC15, Ly6E, MFI2, NOTCH3, p-cadherina, PRLR y RNF43.

135. El uso de conformidad con el punto 133, en donde el tumor asociado con los objetivos comprende un tumor que tiene alta expresión de los objetivos y/o un tumor con objetivos positivos.

136. El uso de conformidad con el punto 133, en donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en: un tumor sólido, un tumor hematológico, y lesión de cáncer metastásica, refractaria o recurrente.

137. El uso de conformidad con el punto 133, en donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de hígado, cáncer de estómago, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de la unión gastroesofágica (GEJ, por sus siglas en inglés), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de células germinales, cáncer de huesos, cáncer de piel, cáncer de timo, cáncer de vías biliares, cáncer de vesícula biliar, melanoma, mesotelioma, linfoma, mieloma (tal como mieloma múltiple), sarcoma, glioblastoma y leucemia.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco proporcionados en esta solicitud, en comparación con los grupos hidrófilos aniónicos y catiónicos de PEG, el conjugado de grupo fluorescente-anticuerpo modificado con grupos solubles en agua en la forma de sal interna de sulfonato aumenta ampliamente la acumulación específica en el sitio de tumor. Los conjugados de anticuerpo-fármaco de esta solicitud introducen una fuerte cadena lateral hidrófila de sal interna de sulfonato y/o sal interna de fosfato en la posición del polipéptido (VC, VA, AAA, etc.)-PAB (grupo autoinmolante) del enlazador. Tanto el grupo sulfonato como el grupo fosfato tienen donante y aceptor de enlace de hidrógeno, pertenecen a un fuerte grupo hidrófilo, y la sal interna de sulfonato o sal interna de fosfato tienen ambas cargas positivas y negativas, mejorando con ello además la hidrofiliidad. Al mismo tiempo, los grupos funcionales solubles en agua en la forma de sales internas también tienen el potencial para mejorar el enfoque de tumor y reducir unión no específica del conjugado de anticuerpo-fármaco, mejorando de esa forma ampliamente la formación de fármaco (incluyendo hidrofiliidad y

estabilidad) del conjugado de anticuerpo-fármaco probado, reduciendo la eliminación del fármaco in vivo, y mejorando eficacia del tratamiento tumoral.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Las figuras se usan para un mejor entendimiento de esta solicitud y no constituyen una limitación inapropiada en esta solicitud, en donde:

las Figuras 1A y 1B muestran el análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) de los conjugados de anticuerpo-fármaco del Ejemplo Comparativo 2 y Ejemplo Experimental 6 de conformidad con esta solicitud.

Las Figuras 2A y 2B muestran el análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de los conjugados de anticuerpo-fármaco del Ejemplo Comparativo 3 y Ejemplo Experimental 9 de conformidad con esta solicitud.

Las Figuras 3A a 3H muestran el análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de los conjugados de anticuerpo-fármaco del Ejemplo Comparativo 1 y Ejemplo Experimental 1, Ejemplo Experimental 5a, Ejemplo Experimental 7, Ejemplo Experimental 9, y Ejemplo Experimental 11 de conformidad con esta solicitud.

Las Figuras 4A y 4B muestran el análisis de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés) de los conjugados de anticuerpo-fármaco del Ejemplo Comparativo 2 y Ejemplo Experimental 6 de conformidad con esta solicitud.

Las Figuras 5A y 5B muestran el análisis de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de los conjugados de anticuerpo-fármaco del Ejemplo Comparativo 3 y Ejemplo Experimental 9 de conformidad con esta solicitud.

Las Figuras 6A a 6H muestran el análisis de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de los conjugados de anticuerpo-fármaco del Ejemplo Comparativo 1 y Ejemplo Experimental 1, Ejemplo Experimental 5a, Ejemplo Experimental 7, Ejemplo Experimental 9, y Ejemplo Experimental 11 de conformidad con esta solicitud.

La Figura 7 muestra el espectro de masas deconvolucional de la cadena ligera del Ejemplo Experimental 5a de conformidad con esta solicitud.

La Figura 8 muestra el espectro de masas deconvolucional de la cadena pesada del Ejemplo Experimental 5a de conformidad con esta solicitud.

La Figura 9 muestra el cromatograma de fase reversa del Ejemplo Experimental 5a de conformidad con esta solicitud.

Las Figuras 10A a 10E muestran las curvas de eliminación celular in vitro de conjugados de anticuerpo-fármaco 9D1 y las muestras de control en células MC38-18.2 de conformidad

con esta solicitud.

Las Figuras 11A a 11C muestran las curvas de efecto terapéutico del tumor de los conjugados de anticuerpo-fármaco 9D1 en el modelo de tumor subcutáneo de ratón MC38-hClaudin18.2 de conformidad con esta solicitud.

5 La Figura 12 muestra las curvas de efecto terapéutico del tumor de los conjugados de anticuerpo-fármaco 9D1 en el modelo de tumor subcutáneo de ratón NUGC4-hClaudin 18.2 de conformidad con esta solicitud.

La Figura 13 muestra las curvas de efecto terapéutico del tumor de conjugados de anticuerpo-fármaco de Farletuzumab-LD-38 en el modelo de tumor subcutáneo de ratón OVCAR-3 de
10 conformidad con esta solicitud.

La Figura 14 muestra las curvas de efecto terapéutico del tumor de conjugados de anticuerpo-fármaco de Farletuzumab-LD-38 en el modelo de tumor subcutáneo de ratón IGROV1 de conformidad con esta solicitud.

La Figura 15 muestra las curvas farmacocinéticas de 9D1-LD-38 y 9D1-GGFG-Exatecan
15 en ratas de conformidad con esta solicitud.

La Figura 16 muestra la actividad citotóxica de 9D1-LD-38, 9D1-LD-82, 9D1-LD-88, y 9D1-LD-89 sobre las células MC38-hClaudin18.2.

La Figura 17 muestra los resultados de muerte celular inmunogénica de las células B16F10 hClaudin18.2 inducida por 9D1-LD-38 and 9D1-GGFG-Dxd.

20 Las Figuras 18A y 18B muestran el efecto de muerte de células espectadoras de 9D1-LD-38 y 9D1-GGFG-Dxd en células.

La Figura 19 muestra el resultado de la liberación de toxina libre Exatecan después de digestión enzimática de 9D1-LD-38.

Las Figuras 20A a 20F muestran los resultados de la estabilidad de incubación de suero
25 in vitro de 9D1-LD-38, 9D1-LD-65, 9D1-LD-73, 9D1-LD-74, y 9D1-Deux tecan (9D1-GGFG-Dxd).

La Figura 21 muestra los resultados de cambios de los valores DAR in vivo de 9D1-LD-38, 9D1-LD-65, y 9D1-Deux tecan (9D1-GGFG-Dxd).

Las Figuras 22A y 22B muestran el contenido de toxinas totales (toxina conjugada + toxina libre) y toxinas libres en el plasma de ratones que portan el tumor tratado con 9D1-LD-38, 9D1-
30 LD-65, y 9D1-Deux tecan (9D1-GGFG-Dxd).

Las Figuras 23A y 23B muestran el contenido de toxinas totales (toxina conjugado + toxina libre) y toxinas libres en los tejidos de ratones que portan tumor tratados con 9D1-LD-38, 9D1-LD-65, y 9D1-Deux tecan (9D1-GGFG-Dxd).

Las Figuras 24A y 24B muestran los resultados farmacodinámicos de 9D1 LD-38, 9D1-
35 Deux tecan (9D1-GGFG-Dxd) and 9D1-vc-PAB-MMAE en modelo de ratón que porta tumor resistente a

fármaco mediado p-gp.

La Figura 25 muestra los resultados farmacodinámicos de 9D1-LD-38 combinado con administración ICI en modelo de ratón que porta tumor inmunocompetente.

Las Figuras 26A y 26B muestran la muerte de células espectadoras de 9D1-LD-38 sobre ratones que portan tumor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La siguiente es una explicación de los Ejemplos ilustrativos de esta solicitud, que incluye varios detalles de los Ejemplos de esta solicitud para un mejor entendimiento. Deben considerarse meramente ilustrativos. Por lo tanto, un experto en la técnica debería reconocer que se pueden realizar varios cambios y modificaciones a los Ejemplos aquí descritos sin apartarse del alcance y espíritu de esta solicitud. De manera similar, para mayor claridad y concisión, la siguiente descripción omite la descripción de las funciones y estructuras bien conocidas.

A menos que se indique lo contrario, las definiciones de ciertos términos usados en la descripción y reivindicaciones de esta solicitud son como a continuación:

"Alquilo" puede ser ramificado o no ramificado, y preferiblemente tiene 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Más preferiblemente, el alquilo tiene aproximadamente 1 a 6 átomos de carbono. Incluso más preferiblemente, el grupo alquilo tiene 1, 2, 3, o 4 átomos de carbono. El alquilo incluye, pero no se limita a: metilo, etilo, n-propil, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, n-hexilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2-etilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, etc. El alquilo puede ser sustituido o no sustituido

"Alquenilo" puede ser ramificado o no ramificado, con uno o más enlaces dobles y 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Más preferiblemente, el alquenilo tiene 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Incluso más preferiblemente, el alquenilo tiene 2, 3, o 4 átomos de carbono. El alquenilo incluye, pero no se limita a: vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-metilvinilo, 1-butenilo, 2-butenilo, y 3-butenilo, etc. El alquenilo puede ser sustituido o no sustituido

"Alquinilo" puede ser ramificado o no ramificado, con uno o más enlaces triples y 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Más preferiblemente, el alquinilo tiene 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Incluso más preferiblemente, el alquinilo tiene 2, 3, o 4 átomos de carbono. El alquinilo incluye, pero no se limita a: acetileno, propileno, 1-butino, etc.

"Aliciclilo" se refiere a sustituyentes cíclicos que no poseen aromaticidad, y pueden ser ya sea sustituyentes de hidrocarburos saturados o insaturados, por ejemplo, puede ser cicloalquilo,

cicloalquenilo, etc.

“Heteroalícicilo” se refiere a grupos sustituyentes formados por compuestos heterocíclicos cuyo esqueleto de anillo comprende al menos un heteroátomo y sin aromaticidad, en donde el heteroátomo puede ser oxígeno, nitrógeno, átomo de azufre, etc., que incluye anillo único, anillo múltiple, anillo fusionado, anillo con puente, y anillo espiral. Por ejemplo, un anillo único de 5 a 7 miembros, o un anillo doble o triple de 7 a 10 miembros, puede comprender 1, 2, o 3 heteroátomos seleccionados de átomo de nitrógeno, oxígeno, y/o azufre. Heteroalícicilo incluye, pero no se limita a: morfolinilo, oxetanilo, tiomorfolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, 1,1-dioxo-tiomorfolinilo, piperidinilo, 2-oxo-piperidinilo, pirrolidinilo, 2-oxo-pirrolidinilo, piperazin-2-ona, 8-oxa-3-azabiccíclico[3.2.1]octilo, piperazinilo, y hexahidropirimidina. El heteroalícicilo puede ser sustituido o no sustituido.

“Arilo” se refiere a un sistema aromático de anillo de carbono que comprende uno o dos anillos, en donde los anillos pueden estar conectados juntos en una forma fusionada. El término “arilo” incluye arilos de anillo únicos o dobles, tal como fenilo, naftilo, y tetrahidronaftilo. Preferiblemente, el arilo es arilo de 6 a 10 átomos de carbono; más preferiblemente, el arilo es fenilo, naftilo; muy preferiblemente, el arilo es naftilo. El arilo puede ser sustituido o no sustituido.

“Heteroarilo” se refiere a un grupo aromático que consiste en un anillo único de 5 a 6 miembros o un anillo doble de 8 a 10 miembros, que puede comprender 1 a 4 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y/o azufre. Ejemplos de “heteroarilo” incluyen, pero no se limitan a: furanilo, piridinilo, 2-oxo-1,2-dihidropiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, tiofenilo, isoxazolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, imidazolilo, pirrolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, benzodioxolilo, benzotiofenilo, benzoimidazolilo, indolilo, isoindolilo, 1,3-dioxo-isoindolilo, quinolinilo, indazolilo, benzoisotiazolilo, benzoxazolilo, benzoisoxazolilo. El heteroarilo puede ser sustituido o no sustituido.

“Sustituido” se refiere a uno o más átomos de hidrógeno, preferiblemente hasta 5, y más preferiblemente 1 a 3 átomos de hidrógeno en un grupo funcional se reemplazan independientemente por un número correspondiente de sustituyentes. No es cierto decir que los sustituyentes sólo se ubican en sus posibles posiciones químicas, y un técnico en la materia puede determinar (mediante experimentos o teoría) sustituciones posibles o imposibles sin un esfuerzo excesivo. Por ejemplo, un amino o hidroxilo con hidrógeno libre puede ser inestable cuando se combina con un átomo de carbono con enlaces insaturados (tal como olefínicos).

El término “sustituido” como se usa aquí, a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un grupo que puede ser sustituido por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en: sustituyentes alquilo, alcoxilo, alquiltio, alquilamino, halógeno, sulfenilo, hidroxilo, nitro, ciano, cicloalquilo, heterocíclico, arilo, heteroarilo, cicloalcoxilo, heterocicloalcoxilo, cicloalquiltio,

heterocicloalquiltio, amino, haloalquilo, hidroxialquilo.

Siempre que un grupo funcional se describe como "opcionalmente sustituido por un sustituyente", puede estar no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes. De manera similar, cuando un grupo se describe como "no sustituido o sustituido", si está sustituido, el sustituyente puede seleccionarse de uno o más de los sustituyentes enlistados. Si no se especifica ningún sustituyente, significa que los grupos "opcionalmente sustituidos" o "sustituidos" pueden ser reemplazados por uno o más grupos, los cuales se seleccionan individual o independientemente de: alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heteroalícililo, aralquilo, heteroaralquilo, (heteroalícilil)alquilo, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, ariloxi, acilo, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halógeno, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amida, N-amida, S-sulfonamida, N-sulfonamida, C-carboxilo, C-carboxilo protegido, O-carboxilo, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, silicilo, sulfenilo, sulfenilo, sulfonilo, haloalquilo, haloalcoxi, trihalometanosulfonilo, trihalometanosulfamina, amino, amino monosustituido, y amino disustituido y sus derivados protegidos.

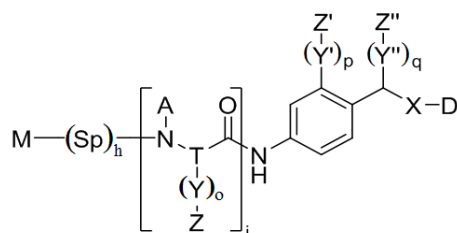
Los sustituyentes de halógeno incluyen F, Cl, Br, e I. "Hidroxilo" se refiere a grupo -OH. Halógenos se refieren a flúor, cloro, bromo, y yodo.

"Amino" se refiere a -NH₂. "Ciano" se refiere a -CN. "Nitro" se refiere a -NO₂. "Carboxilo" se refiere a -C(O)OH. "Acilo" se refiere a -C(O)R.

Los términos "hidrógeno" o "H" en la estructura química aquí usada, a menos que se especifique lo contrario, debe entenderse para incluir no sólo ¹H, sino también deuterio (²H, D), tritio (³H, T), o su mezcla. Los derivados isotópicos deuterinados se refieren a los compuestos correspondientes obtenidos reemplazando uno o más átomos de H con átomos de D en un compuesto.

"Composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de uno o más compuestos aquí descritos, o sus sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los fármacos precursores con otros componentes químicos, así como otros componentes tales como vehículos y excipientes fisiológica y farmacéuticamente aceptables. El objetivo de una composición farmacéutica es promover la administración de un fármaco a organismos vivos, facilitar la absorción de ingredientes activos, y de esa forma ejercer actividad biológica.

La presente solicitud proporciona un compuesto representado por la Fórmula (1), o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la Fórmula (1) tiene la siguiente fórmula estructural:



Fórmula (1)

M es un espaciador; Sp es -L_a-Q_a-; A se selecciona de ausente, hidrógeno o alquilo; T representa un grupo alquilo trivalente (1 a 8 átomos de carbono) lineal o ramificado; Y, Y' e Y'' son cada uno independientemente -L_b-Q_b-; L_a y L_b son cada uno independientemente seleccionados de grupo ausente, alquileo, alquencileno, alquinileno, aliciclicileno, heteroalíciclicileno, arileno, heteroarileno o polietilenglicol, en donde el grupo alquileo, alquencileno, alquinileno, aliciclicileno, heteroalíciclicileno, arileno, heteroarileno o polietilenglicol está opcionalmente sustituido por un sustituyente; Q_a y Q_b son cada uno independientemente seleccionados de ausente, -C(=O)NR-, -C(=O)O-, -OC(=O)NR-, -S(=O)₂NR-, -NRC(=O)-, -OC(=O)-, -NRC(=O)O-, -NRS(=O)₂-, -NRC(=O)NR-, -NHC(=NH)NH-, -C(=O)-, -OC(=O)O-, -O-, -NR-, -S-, S(=O)₂-, S(=O)-, o -Se-, en donde R se selecciona de hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido; Z se selecciona de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido o una sal interna de sulfonato; Z' y Z'' son cada uno independientemente seleccionados de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato; al menos uno de Z, Z' y Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato; X comprende una unidad autoinmoladora o está ausente; D comprende una molécula de fármaco; i es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etc. h es un número entero desde 1 hasta 6, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. o, p, y q son cada uno independientemente un entero desde 0 hasta 5, por ejemplo, puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, etc.

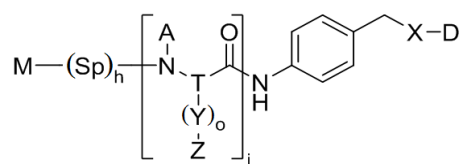
20 Cuando h es mayor que 1, Sp múltiple puede tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas, es decir, L_a múltiple puede tener diferentes estructuras o estructuras idénticas; y Q_a múltiple puede tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas. El número de L_a y Q_a puede ser diferente o idéntico.

25 Cuando i es mayor que 1, A múltiple puede ser diferente o idéntico, T múltiple puede ser diferente o idéntico, Y múltiple puede ser diferente o idéntico, y Z múltiple puede ser diferente o idéntico.

Cuando p es mayor que 1, Y' múltiple puede tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas.

30 Cuando q es mayor que 1, múltiple Y'' puede tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas.

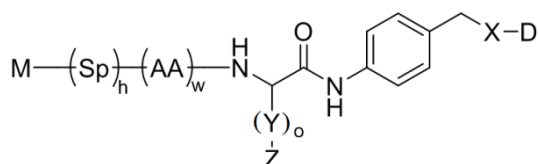
En la presente solicitud, la Fórmula (1) es la Fórmula (1-1):



Fórmula (1-1)

en donde M, Sp, A, T, Y, h, o, i, X, D, y Z se definen como anteriormente; y al menos uno de los i Zs es una sal interna de sulfonato.

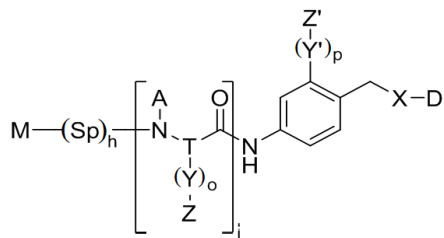
En la presente solicitud, la Fórmula (1-1) es la Fórmula (1-1-1):



Fórmula (1-1-1)

en donde AA es un residuo de aminoácido, y w es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. Cuando w es mayor que 1, múltiples AAs pueden ser residuos aminoácidos idénticos, o residuos aminoácidos diferentes.

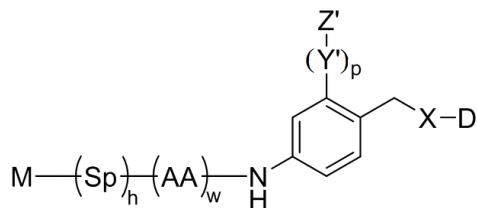
En la presente solicitud, la Fórmula (1) es la Fórmula (1-2):



Fórmula (1-2)

en donde M, Sp, A, T, Y, Z, o, p, i, h, X, Y', y D se definen como anteriormente; y Z' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

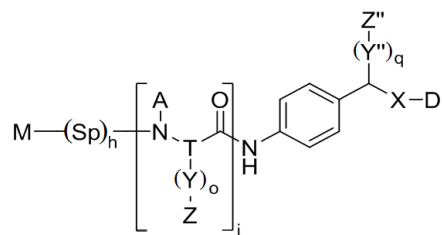
En la presente solicitud, la Fórmula (1) es la Fórmula (1-2-1):



Fórmula (1-2-1)

en donde AA es un residuo de aminoácido, y w es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. Cuando w es mayor que 1, múltiples AAs pueden ser residuos aminoácidos idénticos, o residuos aminoácidos diferentes.

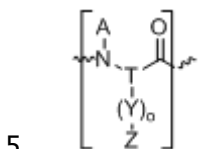
En la presente solicitud, la Fórmula (1) es la Fórmula (1-3):



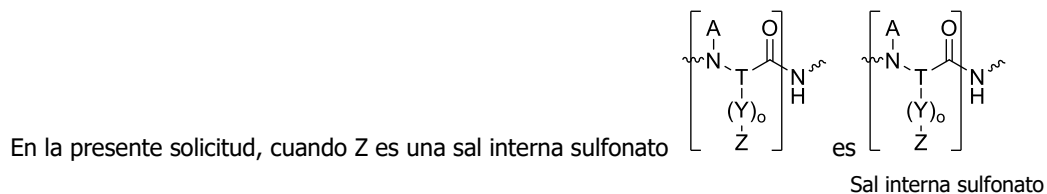
Fórmula (1-3)

en donde M, Sp, A, Y, T, Z, o, i, h, q, X, Y'', y D se definen como anteriormente; y Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

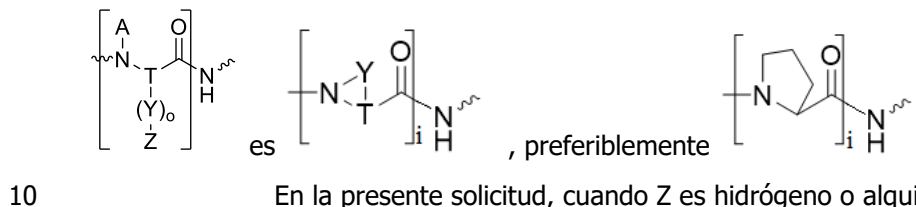
En la presente solicitud, cuando Z es hidrógeno o alquilo opcionalmente sustituido,



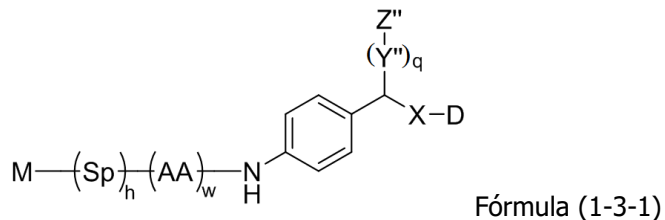
es un residuo aminoácido, también referido como AA.



En la presente solicitud, cuando A y Z están ausentes, N, Y y T forman un anillo, y



En la presente solicitud, cuando Z es hidrógeno o alquilo sustituido opcionalmente, la Fórmula (1) es la Fórmula (1-3-1):



15 en donde AA es un residuo de aminoácido, y w es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. Cuando w es mayor que 1, AAs múltiples pueden ser residuos aminoácidos idénticos, o residuos aminoácidos diferentes.

En la presente solicitud, el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina.

En la presente solicitud, el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: valina, ácido glutámico, citrulina, lisina, alanina, fenilalanina, arginina, glutamina, asparagina, y glicina.

5 En la presente solicitud, el(los) aminoácido(s) es(son) uno o más seleccionado(s) del grupo que consiste en: valina, citrulina, alanina, fenilalanina, glutamina, y glicina.

Cuando w es mayor que 1, múltiples AAs pueden ser diferentes o idénticas, los detalles son como los siguientes:

En algunas modalidades, cuando w es 2, dos AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina y residuo de citrulina.

10 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 2, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina y residuo de citrulina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; por ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, dos residuos de valina y un residuo de citrulina. Como otro ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera
15 independiente, un residuo de valina y dos residuos de citrulina.

En algunas modalidades, cuando w es 2, dos AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, un residuo de valina y un residuo de alanina.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 2, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina y residuo de alanina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; por ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, dos residuos de valina y un residuo de alanina. Como otro ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera
20 independiente, un residuo de valina y dos residuos de alanina.

En algunas modalidades, cuando w es 2, dos AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, un residuo de valina y un residuo de fenilalanina.
25

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 2, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina y residuo de fenilalanina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; por ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, dos residuos de valina y un residuo de fenilalanina. Como otro ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera
30 independiente, un residuo de valina y dos residuos de fenilalanina.

En algunas modalidades, cuando w es 2, dos AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, un residuo de valina y un residuo de glutamina.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 2, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de
35

valina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más; por ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, dos residuos de valina y un residuo de glutamina. Como otro ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, un residuo de valina y dos residuos de glutamina.

5 En algunas modalidades, cuando w es 2, dos AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, un residuo de valina y un residuo de glicina.

 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 2, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más; por ejemplo,
10 cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, dos residuos de valina y un residuo de glicina. Como otro ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, un residuo de valina y dos residuos de glicina.

 En algunas modalidades, cuando w es 2, dos AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, un residuo de citrulina y un residuo de alanina.

15 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 2, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina y residuo de alanina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; por ejemplo,
 cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera independiente, dos residuos de citrulina y un residuo de alanina. Como otro ejemplo, cuando w es 3, los tres AAs son, cada uno de manera
20 independiente, un residuo de citrulina y dos residuos de alanina.

 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina y residuo de fenilalanina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más.

 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de
25 manera independiente, residuo de citrulina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

30 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de alanina y residuo de fenilalanina, en donde el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más.

 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de alanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de
35 alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de alanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

5 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de fenilalanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de fenilalanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

10 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de glutamina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina y residuo de alanina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más.

20 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina y residuo de fenilalanina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

25 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

30 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de alanina y residuo de fenilalanina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más.

35 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de alanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2

o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuos de valina, residuo de alanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más;
- 5 o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de fenilalanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

- 10 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de fenilalanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de glutamina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.
- 15

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina, residuo de alanina y residuo de fenilalanina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más.
- 20

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina, residuo de alanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.
- 25

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina, residuo de alanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

- 30 En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de alanina, residuo de fenilalanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de alanina, residuo de fenilalanina y residuo de glicina, en donde el
- 35

número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de fenilalanina, residuo de glutamina y residuo de glicina, en donde el
5 número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina, residuo de alanina y residuo de fenilalanina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos
10 de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina, residuo de alanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de
15 citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina, residuo de alanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de citrulina
20 puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina, residuo de alanina, residuo de fenilalanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos
25 de alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina, residuo de alanina, residuo de fenilalanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de
30 alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de alanina, residuo de fenilalanina, residuo de glutamina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de
35 fenilalanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más; o el

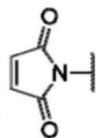
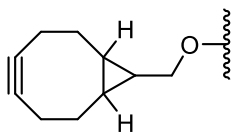
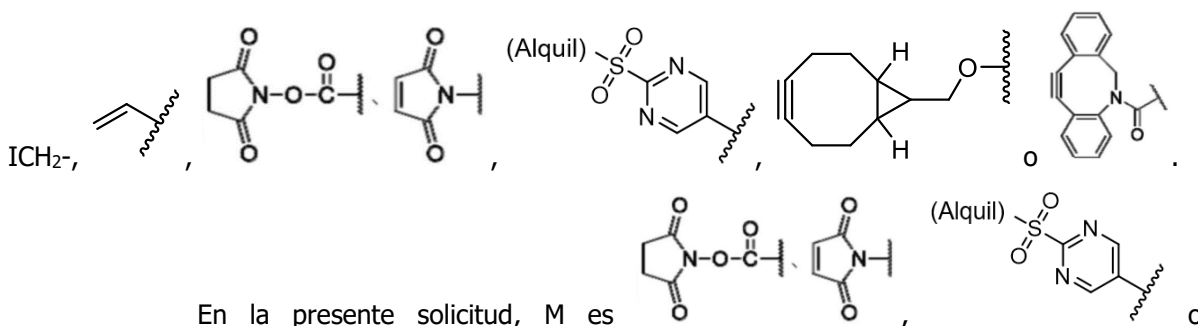
número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina, residuo de alanina, residuo de fenilalanina y residuo de glutamina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más.

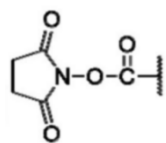
- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de valina, residuo de citrulina, residuo de alanina, residuo de fenilalanina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de valina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

- En algunas modalidades, cuando w es mayor que 1, w AAs pueden ser, cada uno de manera independiente, residuo de citrulina, residuo de alanina, residuo de fenilalanina, residuo de glutamina y residuo de glicina, en donde el número de residuos de citrulina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de alanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de fenilalanina puede ser 1, 2 o más; el número de residuos de glutamina puede ser 1, 2 o más; o el número de residuos de glicina puede ser 1, 2 o más.

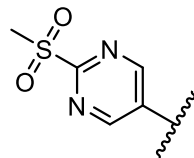
- En la presente solicitud, M es N_3 , SH, ONH_2 , NH_2 , CO_2H , (alquil)- $CO-$, $HCO-$, $BrCH_2-$,



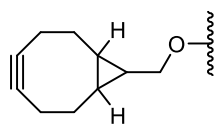
En algunas modalidades, M es



En algunas modalidades, M es .



En algunas modalidades, M es .

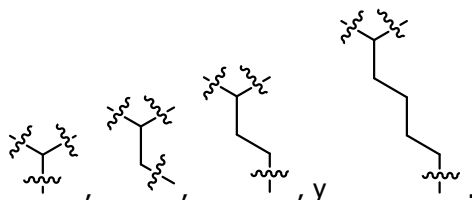


En algunas modalidades, M es .

En la presente solicitud, A es hidrógeno, metilo, etilo o propilo.

5 En la presente solicitud, A es hidrógeno. En algunas modalidades, A es metilo. En algunas modalidades, A es etilo. En algunas modalidades, A es propilo.

En la presente solicitud, el T es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:



En algunas modalidades, T es .

10 En la presente solicitud, L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo, alquenileo, alquinileo, alicicilieno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo, heteroalicicilieno saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo y 1 a 4 heteroátomos, arileno con 6 a 18 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarileno con 6 a 18 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol; y en
15 donde el alquileo, alquenileo, alquinileo, alicicilieno, heteroalicicilieno, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

En la presente solicitud, L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquenileo lineal o ramificado
20 de 2 a 12 átomos de carbono, alquinileo lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alicicilieno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo, heteroalicicilieno saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo y 1 a 4 heteroátomos, o arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarileno con 6 a 10 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más

anillos, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquienilo, alquinilo, aliciclicilo, heteroaliciclicilo, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre. Además, L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, alquienilo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono o alquinilo lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; y en donde el alquileo, alquienilo, o alquinilo está opcionalmente sustituido por un sustituyente.

Además, L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; el grupo polietilenglicol es $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, o $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, y n es un número entero igual a o mayor que 1.

Además, L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: etilideno, propilideno lineal, butilideno lineal, pentilideno lineal, y $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$; y en donde n es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

Además, L_a es etilideno y/o $-(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2-$ o pentilideno.

En algunas modalidades, el número de L_a es 2, en donde uno es etilideno y el otro es $-(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2-$.

En algunas modalidades, cuando el número de L_a es 1, es etilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_a es 1, es $-(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2-$.

En la presente solicitud, L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo, alquienilo, alquinilo, aliciclicilo saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo, heteroaliciclicilo saturado o insaturado con 3 a 10 átomos de carbono del anillo y 1 a 4 heteroátomos, arileno con 6 a 18 átomos de carbono en uno o más anillos, o heteroarileno con 6 a 18 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol;

el alquileo, alquienilo, alquinilo, aliciclicilo, heteroaliciclicilo, arileno, o heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

Además, L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 10 átomos de carbono, alquienilo lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, alquinilo lineal o ramificado de 2 a 12 átomos de carbono, aliciclicilo saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo, heteroaliciclicilo saturado o insaturado con 3 a 6 átomos de carbono en el anillo y 1 a 4 heteroátomos, o arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, heteroarileno con 6 a 10 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos en uno o más anillos, y grupo polietilenglicol;

el alquileo, alquienilo, alquinilo, aliciclicilo, heteroaliciclicilo, arileno, o

heteroarileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente; y el heteroátomo se selecciona de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

Además, L_b se selecciona de alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, alquenileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o alquinileno lineal o ramificado de 2 a 6 átomos de carbono, o grupo polietilenglicol;

el grupo polietilenglicol es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, $-CH_2O(CH_2CH_2O)_n-$, y $-CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2-$; n es un número entero igual a o mayor que 1; y el alquileo, alquenileno, o alquinileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente.

Además, L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y arileno de 6 a 10 átomos de carbono.

Además, L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: metileno, etileno, *n*-propilideno, isopropilideno, *n*-butilideno, isobutilideno, *sec*-butilideno, *terc*-butilideno, y bencilideno.

Cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b pueden tener estructuras diferentes o estructuras idénticas; los detalles son los siguientes:

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, metileno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, etilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, *n*-propilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, isopropilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, *n*-butilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, isobutilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, *sec*-butilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, *terc*-butilideno. En algunas modalidades, cuando el número de L_b es 1 o más, cada L_b es, de manera independiente, bencilideno.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno y etilideno, en donde el número de metilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; por ejemplo, cuando el número de L_b es 3, los tres L_b son, cada uno de manera independiente, dos metilenos y un etilideno. En otro ejemplo, cuando el número de L_b es 3, los tres L_b son, cada uno de manera independiente, un metileno y dos etilidenos.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno y *n*-propilideno, en donde el número de metileno puede

ser 1, 2 o más; y el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; por ejemplo, cuando el número de L_b es 3, los tres L_b son, cada uno de manera independiente, dos metilenos y un n-propilideno. En otro ejemplo, cuando el número de L_b es 3, los tres L_b son, cada uno de manera independiente, un metileno y dos n-propilidenos.

5 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno e isopropilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; y el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más.

 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno y n-butilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; y el número de n-butilideno puede ser 1, 2 o más.

10 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno e isobutilideno, en donde el número de metileno(s) puede ser 1, 2 o más; y el número de isobutilideno puede ser 1, 2 o más.

 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno y sec-butilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; y el número de sec-butilideno puede ser 1, 2 o más.

15 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno y terc-butilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; y el número de terc-butilideno puede ser 1, 2 o más.

20 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno y bencilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; y el número de bencilideno puede ser 1, 2 o más.

 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, etilideno y n-propilideno, en donde el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más.

25 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, etilideno e isopropilideno, en donde el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más.

 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, etilideno y n-butilideno, en donde el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de n-butilideno puede ser 1, 2 o más.

30 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, etilideno e isobutilideno, en donde el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de isobutilideno puede ser 1, 2 o más.

35 En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son,

cada uno de manera independiente, etilideno y sec-butilideno, en donde el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de sec-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, etilideno y terc-butilideno, en donde el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de terc-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, etilideno y bencilideno, en donde el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de bencilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, n-propilideno e isopropilideno, en donde el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, n-propilideno y n-butilideno, en donde el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de n-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, n-propilideno e isobutilideno, en donde el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de isobutilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, n-propilideno y sec-butilideno, en donde el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de sec-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, n-propilideno y terc-butilideno, en donde el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de terc-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, n-propilideno y bencilideno, en donde el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de bencilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, isopropilideno y n-butilideno, en donde el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de n-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, isopropilideno e isobutilideno, en donde el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de isobutilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, isopropilideno y sec-butilideno, en donde el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de sec-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, isopropilideno y terc-butilideno, en donde el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de terc-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, isopropilideno y bencilideno, en donde el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de bencilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno, etilideno y n-propilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno, etilideno e isopropilideno, en donde el número de metilideno puede ser 1, 2 o más; el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno, etilideno, n-propilideno e isopropilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más.

En algunas modalidades, cuando el número de L_b es mayor que 1, múltiples L_b son, cada uno de manera independiente, metileno, etilideno, n-propilideno, isopropilideno y n-butilideno, en donde el número de metileno puede ser 1, 2 o más; el número de etilideno puede ser 1, 2 o más; el número de n-propilideno puede ser 1, 2 o más; el número de isopropilideno puede ser 1, 2 o más; y el número de n-butilideno puede ser 1, 2 o más.

En la presente solicitud, Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)NR-$, $-NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRC(=O)NR-$, $NHC(=NH)NH-$, $-C(=O)-$, y $-OC(=O)O-$; en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

Además, Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-C(=O)NR-$, $-NRC(=O)NR-$, $-OC(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, y $-OC(=O)-$; en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

Además, Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-C(=O)-$, $-NR-$, $-NRC(=O)-$, y $-(C=O)NR-$; en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

Además, Q_a es $-C(=O)-$, $-N(CH_3)-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)-NH-$, o $-C(=O)-N(CH_3)-$.

En algunas modalidades, cuando el número de Q_a es uno, éste es $-C(=O)-$.

En algunas modalidades, cuando el número de Q_a es dos, uno es $-C(=O)-$, el otro es $-C(=O)-NR-$, y R es metilo.

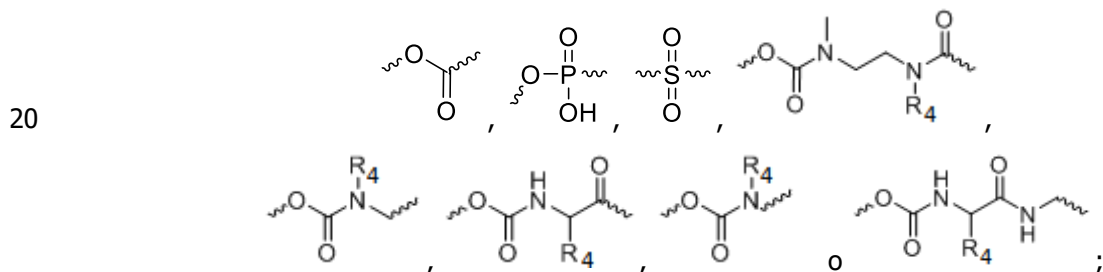
En algunas modalidades, cuando el número de Q_a es dos, uno es $-C(=O)-$, el otro es $-NR-$, y R es metilo.

En la presente solicitud, Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRC(=O)NR-$, $NHC(=NH)NH-$, $-C(=O)-$, and $-OC(=O)O-$; en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

Además, Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)NR-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, y $-NRC(=O)NR-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

Además, Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)NR-$, y $-C(=O)NR-$; and R es hidrógeno o metilo.

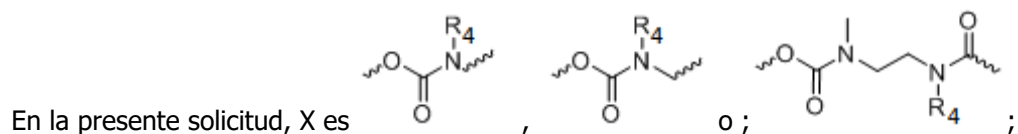
En algunas modalidades, Q_b está ausente. En algunas modalidades Q_b es $-C(=O)-$. En algunas modalidades, Q_b es $-NRC(=O)-$, R es hidrógeno. En algunas modalidades, Q_b es $-NRC(=O)-$, R es metilo. En algunas modalidades, Q_b es $-NRC(=O)NR-$, R es metilo. En algunas modalidades, Q_b es $-C(=O)NR-$, and R es hidrógeno. En algunas modalidades, Q_b es $-C(=O)NR-$, and R es metilo. En la presente solicitud, X se selecciona de:



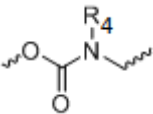
la línea ondulada en el lado derecho de X está conectada a D;

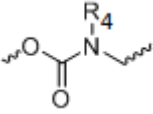
R_4 se selecciona de hidrógeno, alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, $-(CH_2CH_2O)_mR_2$, $-CH_2CH_2NR_2R_3$, o $-CH_2CH_2SO_2R_2$;

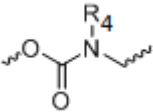
R_2 , y R_3 son cada uno independientemente seleccionados de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono; y m es un número entero mayor que 1.

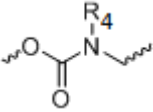


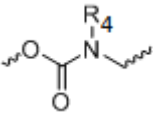
R_4 es hidrógeno, metilo, $-CH_2CH_2OCH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2NMe_2$, o $-CH_2CH_2SO_2Me$.

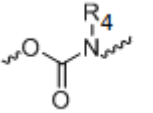
En algunas modalidades, X es , y R₄ es hidrógeno.

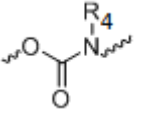
En algunas modalidades, X es , y R₄ es metilo.

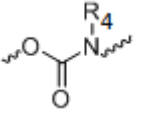
En algunas modalidades, X es , y R₄ es -CH₂CH₂OCH₂CH₂OH.

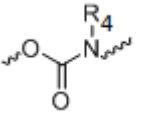
En algunas modalidades, X es , y R₄ es -CH₂CH₂NMe₂.

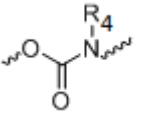
5 En algunas modalidades, X es , R₄ es -CH₂CH₂SO₂Me.

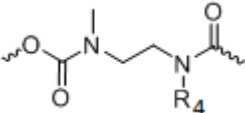
En algunas modalidades, X es , y R₄ es hidrógeno.

En algunas modalidades, X es , R₄ es metilo.

En algunas modalidades, X es , y R₄ es -CH₂CH₂OCH₂CH₂OH.

10 En algunas modalidades, X es , R₄ es -CH₂CH₂NMe₂.

En algunas modalidades, X es , y R₄ es -CH₂CH₂SO₂Me.

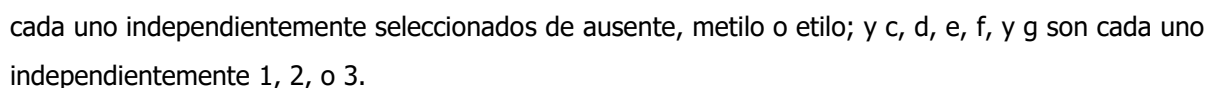
En algunas modalidades, X es , y R₄ es hidrógeno.

*C(=O)N(C)CCN(R4)C(=O)**C(=O)N(C)CCN(R4)C(=O)**C(=O)N(C)CCN(R4)C(=O)*

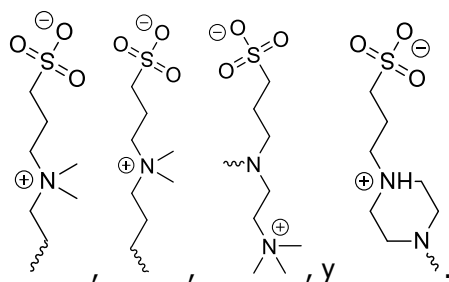
5 En la presente solicitud, la sal interna de sulfonato es



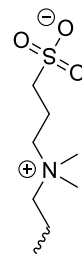
Además, la sal interna de sulfonato es



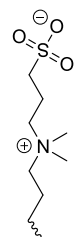
15 Además, la sal interna de sulfonato tiene una fórmula estructural seleccionada del grupo que consiste en:



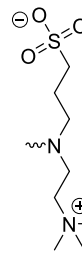
En algunas modalidades, la sal interna de sulfonato es



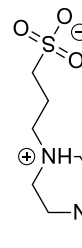
En algunas modalidades, la sal interna de sulfonato es



En algunas modalidades, la sal interna de sulfonato es

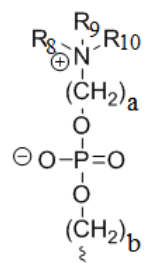


En algunas modalidades, la sal interna de sulfonato es



5

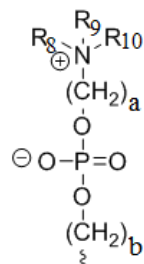
En la presente solicitud, la sal interna de fosfato es



, en donde a y b son cada uno independientemente un número entero

seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y R_8 , R_9 y R_{10} son cada uno independientemente seleccionados de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

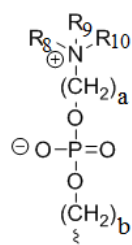
En la presente solicitud, la sal interna de fosfato es



, en donde R_8 , R_9 , y R_{10} son cada uno independientemente metilo o etilo;

5 a es 1, 2, o 3; b es 1, 2, o 3.

Además, la sal interna de fosfato es



, en donde R_8 , R_9 , y R_{10} son cada uno independientemente metilo; a es 2;

y b es 1.

En la presente solicitud, el D comprende una citotoxina o agonista inmunológico.

10 En la presente solicitud, la citotoxina es uno, o dos seleccionados del grupo que consiste en: un inhibidor de microtubulina, un inhibidor de síntesis de ADN, un inhibidor de topoisomerasa, y un inhibidor de ARN polimerasa-2.

En la presente solicitud, la citotoxina es uno, dos, o más seleccionados del grupo que consiste en: auristatina, mertansina DM, caliqueamicina, duocarmicina, pirrolobenzodiazepina, derivado de camptotecina, y α -amanitina.

15 En la presente solicitud, el agonista inmunológico se selecciona de agonista de TLR7/8 o agonista de STING.

En la presente solicitud, i es un número entero dese 2 hasta 8, por ejemplo, puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

20 En la presente solicitud, h es un número entero desde 1 hasta 4, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3 o 4.

En la presente solicitud, o, p, y q son cada uno independientemente un número entero desde 0 hasta 3, por ejemplo, puede ser 0, 1, 2 o 3.

25 En la presente solicitud, L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, y grupo polietilenglicol; el grupo polietilenglicol es $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, -

$\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, o $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-$, n es un número entero igual a o mayor que 1; Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})-$ y $-(\text{C}=\text{O})\text{NR}-$; y en donde R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

Además, L_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: etilideno, propilideno lineal, butilideno lineal, pentilideno lineal, y $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$; en donde n es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; Q_a es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})-$, y $-(\text{C}=\text{O})\text{NR}-$; y en donde R es metilo y/o hidrógeno.

Además, L_a es etilideno y/o $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2-$ o pentilideno; Q_a es $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$ y/o $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$.

En algunas modalidades, el número de L_a es dos, en donde uno es etilideno y el otro es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2-$; el número de Q_a es dos, en donde uno es $-\text{C}(=\text{O})-$ y el otro es $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$.

En algunas modalidades, el número de L_a es uno, que es pentilideno; el número de Q_a es uno, que es $-\text{C}(=\text{O})-$.

En algunas modalidades, el número de L_a es uno, que es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2-$; el número de Q_a es dos, uno es $-\text{C}(=\text{O})-$ y el otro es $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$.

En algunas modalidades, el número de L_a es uno, que es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2-$; el número de Q_a es dos, en donde uno es $-\text{C}(=\text{O})-$ y el otro es $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)-$.

En algunas modalidades, el número de L_a es dos, y son, cada uno de manera independiente, etilideno y pentilideno; el número de Q_a es dos, en donde uno es $-\text{C}(=\text{O})-$ y el otro es $-\text{N}(\text{CH}_3)-$.

En la presente solicitud, L_b se selecciona de alquileo lineal o ramificado con 1 a 6 átomos de carbono, alquenileno lineal o ramificado con 2 a 6 átomos de carbono, o alquinileno lineal o ramificado con 2 a 6 átomos de carbono, arileno con 6 a 10 átomos de carbono en uno o más anillos, o un grupo de polietilenglicol,

el grupo de polietilenglicol es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ y $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2-$; n es un número entero igual o mayor que 1; y el alquileo, alquenileno o alquinileno está opcionalmente sustituido por un sustituyente.

Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}-$, $-\text{NRC}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{NRC}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NRS}(=\text{O})_2-$, $-\text{NRC}(=\text{O})\text{NR}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, y $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido.

Además, L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: alquileo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, o arileno de 6 a 10 átomos de carbono; Q_b es uno,

dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)NR-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)NR-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, y $-NRC(=O)NR-$; y R se selecciona de hidrógeno, o alquilo lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono.

Además, L_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: metileno, etileno, n-propilideno, isopropilideno, n-butilideno, isobutilideno, sec-butilideno, terc-butilideno, y bencilideno;

Q_b es uno, dos, tres o más seleccionados del grupo que consiste en: ausente, $-C(=O)-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=O)NR-$, y $-C(=O)NR-$; y R es hidrógeno o metilo.

En algunas modalidades, en el Y, cuando el número de L_b es dos, en donde uno es metileno, y el otro es isopropilideno; y Q_b está ausente.

En algunas modalidades, en Y, cuando el número de L_b es tres, estos son, cada uno de manera independiente, metilideno, isopropilideno y etilideno; el número de Q_b es uno, y es $-C(=O)NR-$; y R es hidrógeno.

En algunas modalidades, en Y, cuando el número de L_b es dos, en donde uno es etilideno y el otro es isopropilideno; el número de Q_b es uno, y es $-C(=O)NR-$; y R es hidrógeno.

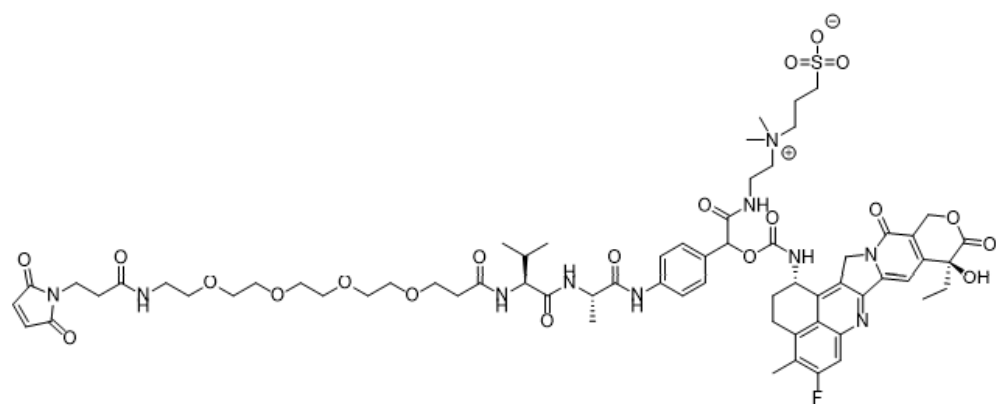
En algunas modalidades, en Y, cuando el número de L_b es dos, en donde uno es n-propilideno y el otro es isopropilideno; el número de Q_b es uno, y es $-NRC(=O)NR-$; y R es hidrógeno.

En algunas modalidades, en Y, cuando el número de L_b es uno, y es bencilideno; y Q_b está ausente.

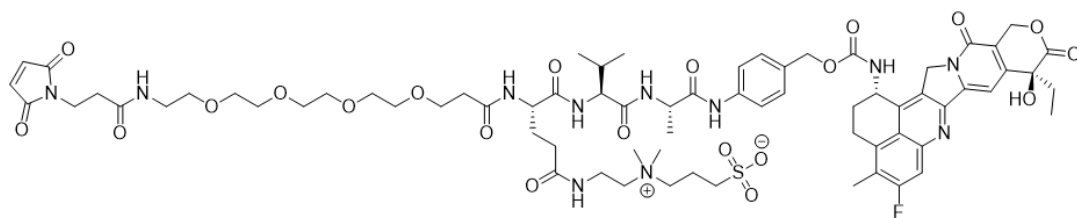
En algunas modalidades, en Y, cuando el número de L_b es dos, estos son, cada uno de manera independiente, etilideno e isopropilideno; y el número de Q_b es uno, y es $-C(=O)-$.

En la presente solicitud, el sustituyente es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en: deuterio, tritio, halógeno, amino, hidroxilo, ciano, nitro, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo, alquinilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, acilo, amino opcionalmente sustituido, aminoformilo opcionalmente sustituido, tioaminoformilo opcionalmente sustituido, sulfamina opcionalmente sustituida, hidroxilos opcionalmente sustituidos, tioalquilo opcionalmente sustituido (SH), y sililo opcionalmente sustituido.

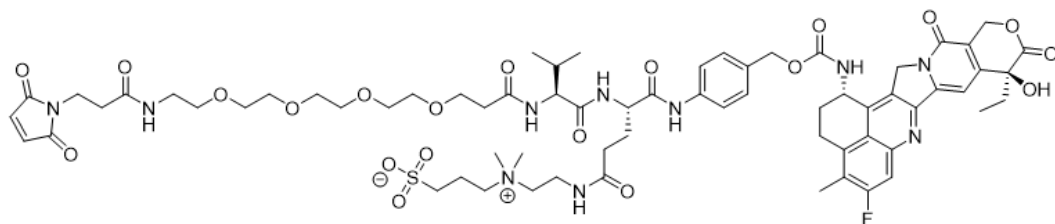
En la presente solicitud, el compuesto es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:



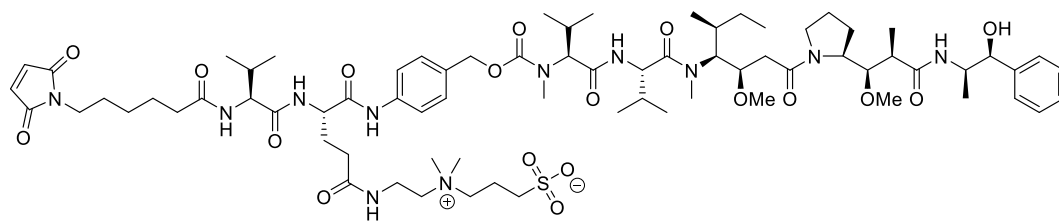
LD-31,



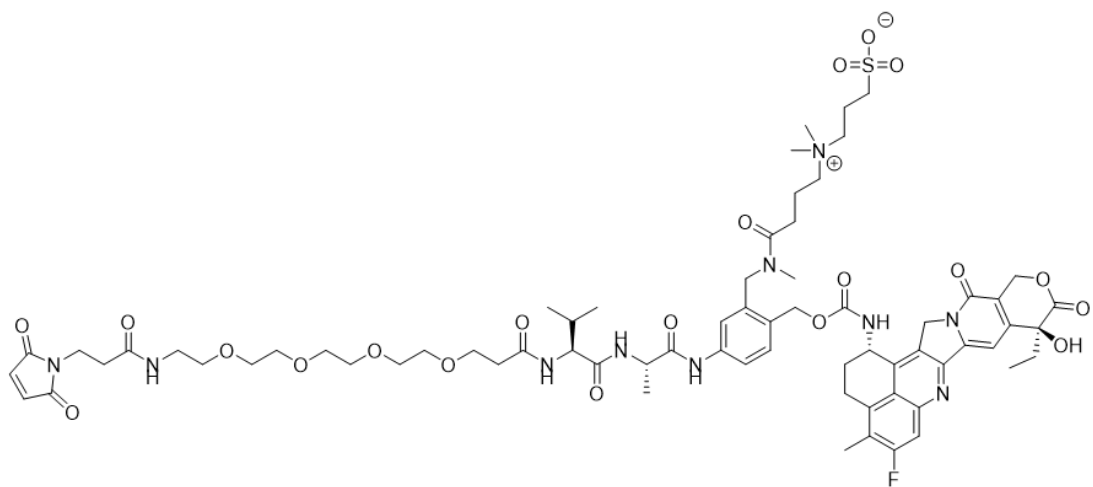
LD-37,



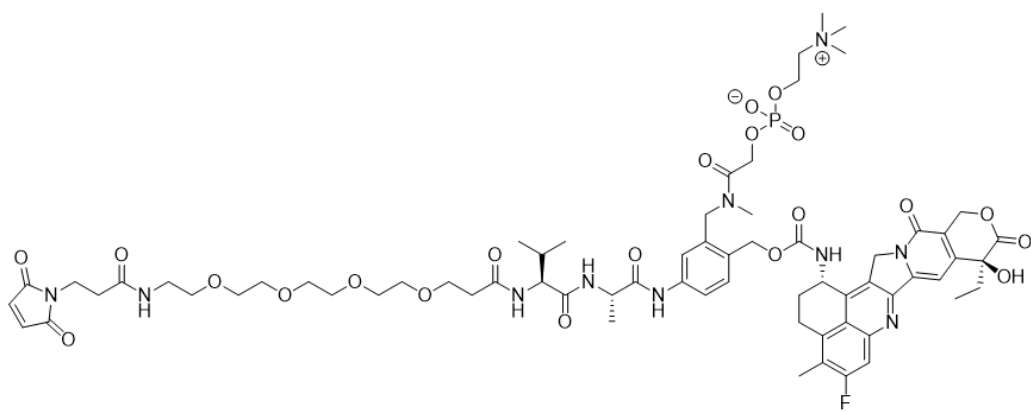
LD-38,



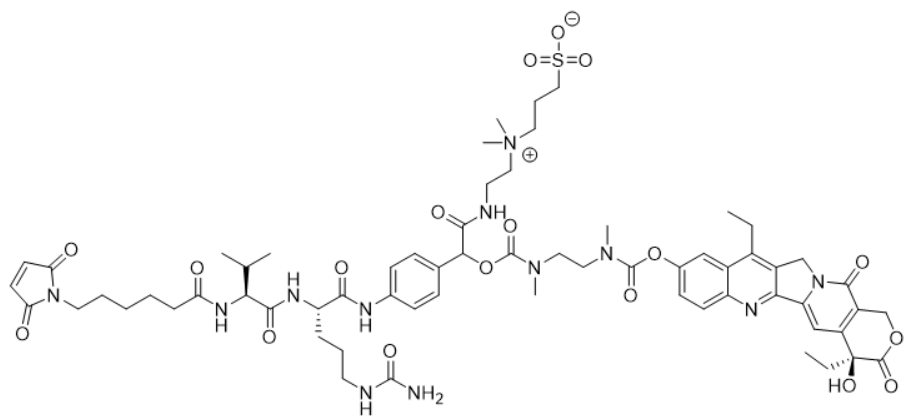
LD-57,



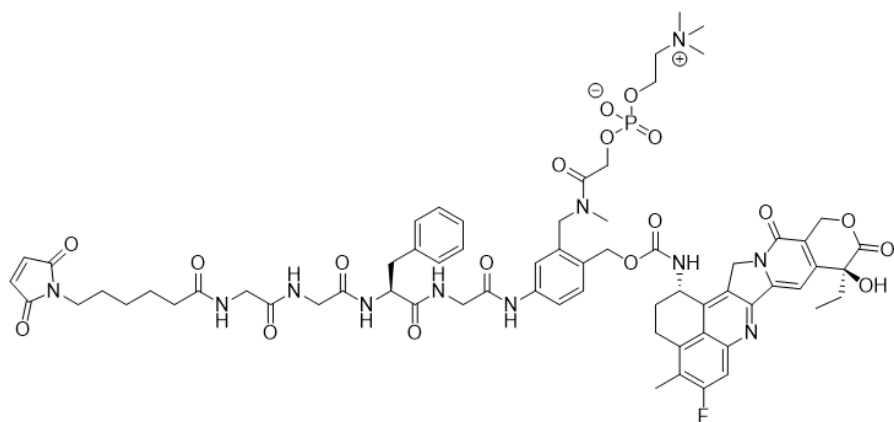
LD-65,



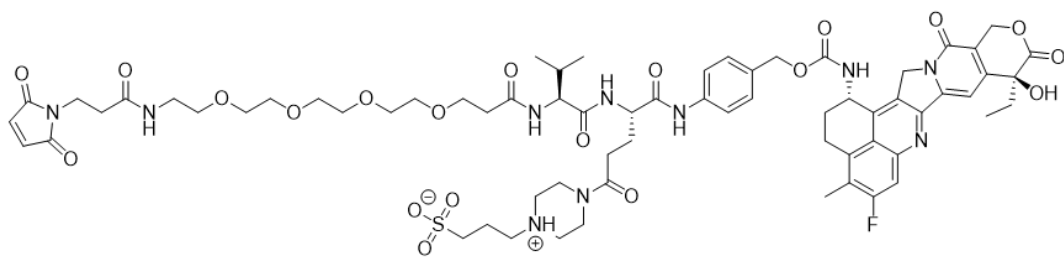
LD-66,



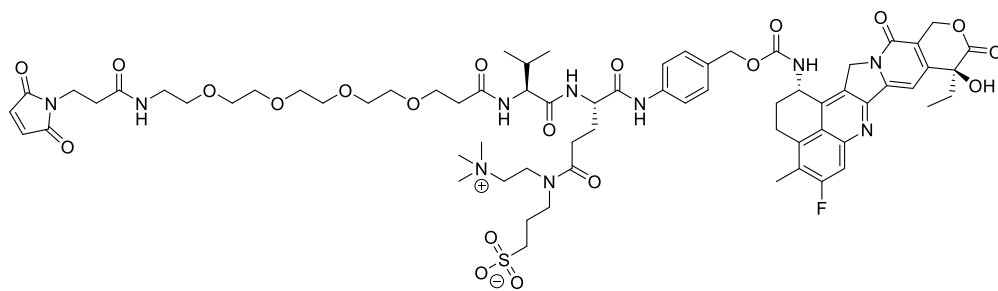
LD-71,



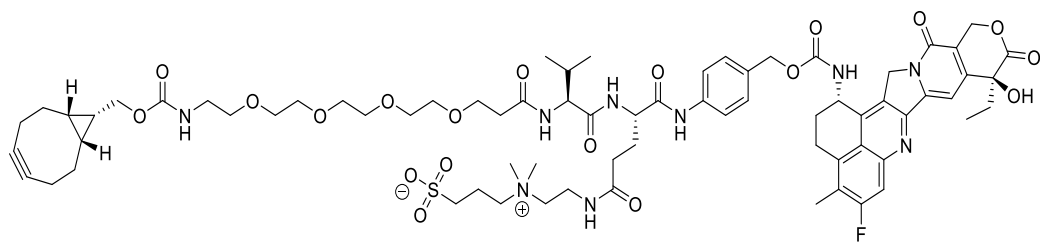
LD-72,



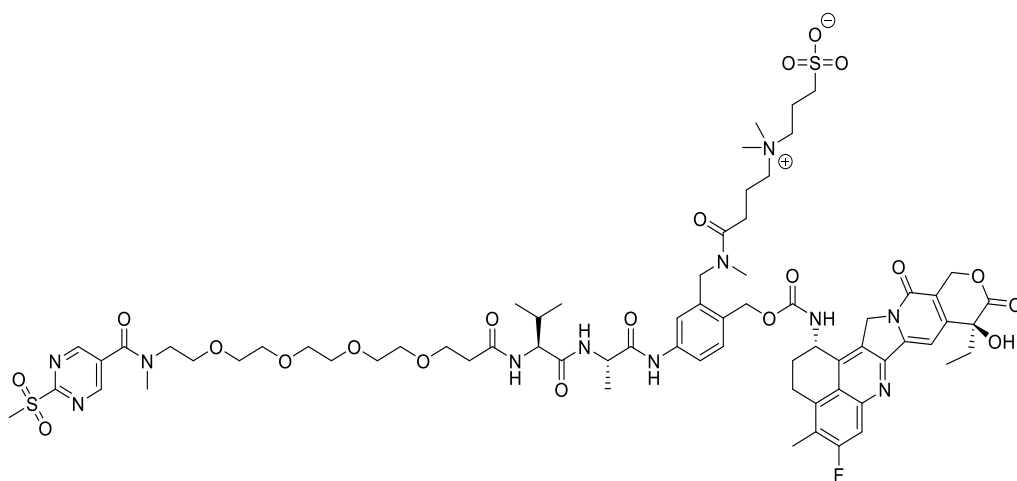
LD-88,



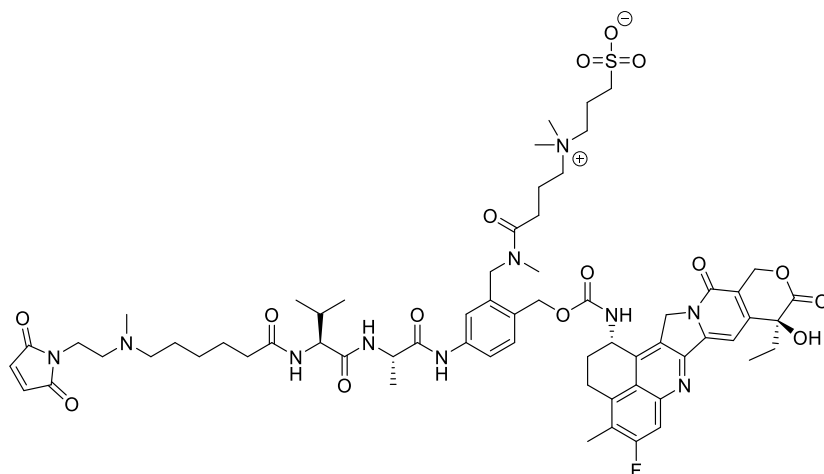
LD-89,



LD-94,

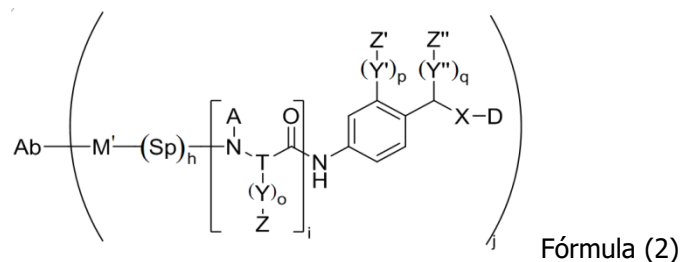


LD-98, y



LD-99.

La presente solicitud también proporciona un compuesto representado por la Fórmula (2), o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la Fórmula (2) tiene la siguiente fórmula estructural:



en donde Ab comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; M' es un espaciador; Sp es -L_a-Q_a-; A se selecciona de ausente, hidrógeno o alquilo; T representa un grupo alquilo trivalente (1 a 8 átomos de carbono) lineal o ramificado; Y, Y' e Y'' son cada uno independientemente -L_b-Q_b-; L_a, L_b son cada uno independientemente seleccionados de grupo ausente, alquileo, alquenileno, alquinileno, alicicileno, heteroalícileno, arileno, heteroarileno o

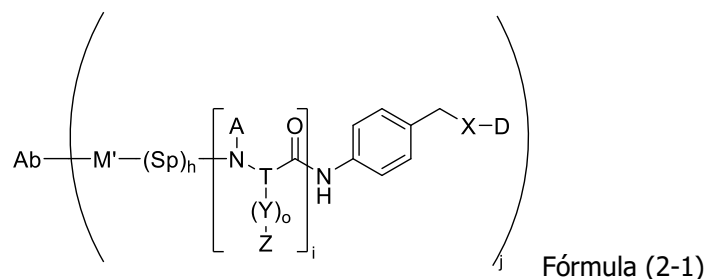
polietilenglicol, en donde el grupo alquileo, alquenileno, alquinileno, alicicilileno, heteroalícicilileno, arileno, heteroarileno o polietilenglicol está opcionalmente sustituido por un sustituyente; Q_a , y Q_b son cada uno independientemente seleccionados de ausente, $-C(=O)NR-$, $-C(=O)O-$, $-OC(=O)NR-$, $-S(=O)_2NR-$, $-NRC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-NRC(=O)O-$, $-NRS(=O)_2-$, $-NRC(=O)NR-$, $-NHC(=NH)NH-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)O-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $S(=O)_2-$, $S(=O)-$, o $-Se-$; en donde R se selecciona de hidrógeno o alcilo opcionalmente sustituido; Z se selecciona de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido o una sal interna de sulfonato; Z', y Z'' son cada uno independientemente seleccionados de ausente, hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato; al menos uno de Z, Z' y Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato; X comprende una unidad autoinmoladora o está ausente; D comprende una molécula de fármaco; e i es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, etc.

h es un número entero de 1 a 6, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. o, p, y q son cada uno independientemente un número entero de 0 a 5, por ejemplo, puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, etc. j es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, etc.

Cuando h es mayor que 1, múltiple Sp puede tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas, es decir, múltiple L_a puede tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas; y múltiple Q_a puede tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas. El número de L_a y Q_a pueden ser diferentes o idénticos, y múltiple Z puede ser diferente o idéntico.

Cuando p es mayor que 1, múltiples Y's pueden tener diferentes estructuras, o estructuras idénticas.

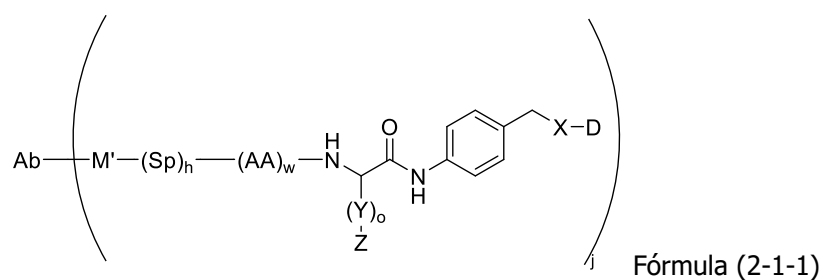
En la presente solicitud, la Fórmula (2) es la Fórmula (2-1):



en donde Ab, M', Sp, A, T, Y, h, o, i, j, X, D, y Z se definen como en la Fórmula (1) descrita anteriormente.

Al menos uno de los i Zs es una sal interna de sulfonato.

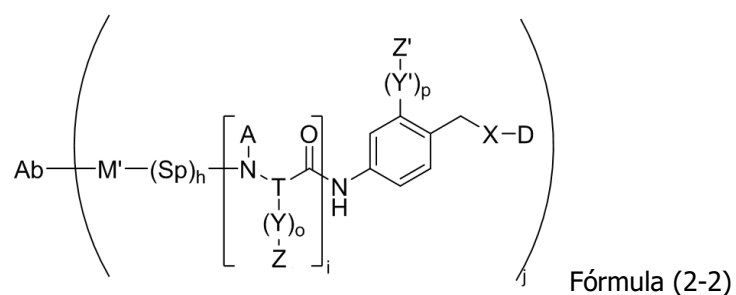
Además, la Fórmula (2-1) es la Fórmula (2-1-1):



en donde AA es un residuo de aminoácido,

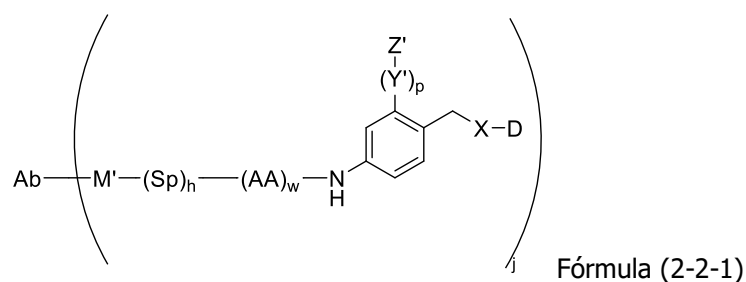
and w es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. Cuando w es mayor que 1, múltiple AAs pueden ser residuos aminoácidos idénticos, o
5 diferentes residuos aminoácido.

En la presente solicitud, la Fórmula (2) es la Fórmula (2-2):



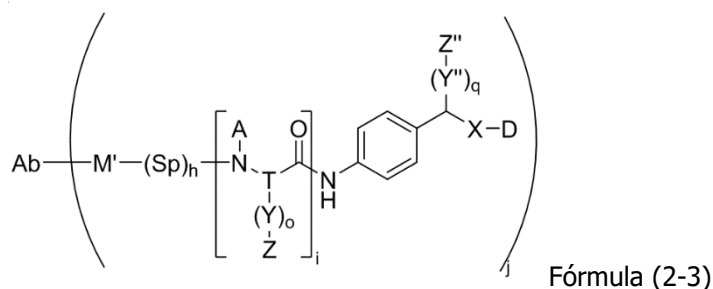
en donde Ab, M', Sp, A, T, Y, Z, o, p, i, h, j, X, Y', y D se definen como en la Fórmula (1) descrita anteriormente; y Z' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

Además, la Fórmula (2-2) es la Fórmula (2-2-1):



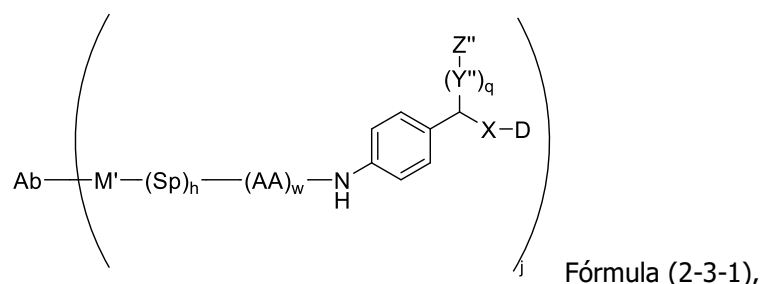
en donde AA es un residuo de aminoácido, y w es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. Cuando w es mayor que 1, múltiples AAs pueden ser residuos aminoácido idénticos, o diferentes residuos aminoácidos.

En la presente solicitud, la Fórmula (2) es la Fórmula (2-3):



en donde Ab, M', Sp, A, Y, T, Z, o, i, h, j, q, X, Y'', y D se definen como en la Fórmula (1) descrita anteriormente; y Z'' es una sal interna de sulfonato o una sal interna de fosfato.

Además, la Fórmula (2-3) es la Fórmula (2-3-1):



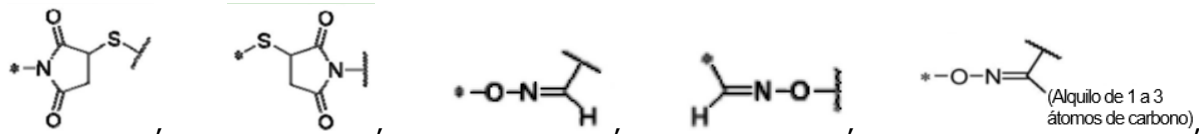
5

en donde AA es un residuo de aminoácido, y w es un número entero igual a o mayor que 1, por ejemplo, puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, etc. Cuando w es mayor que 1, múltiples AAs pueden ser residuos aminoácido idénticos, o diferentes residuos aminoácido.

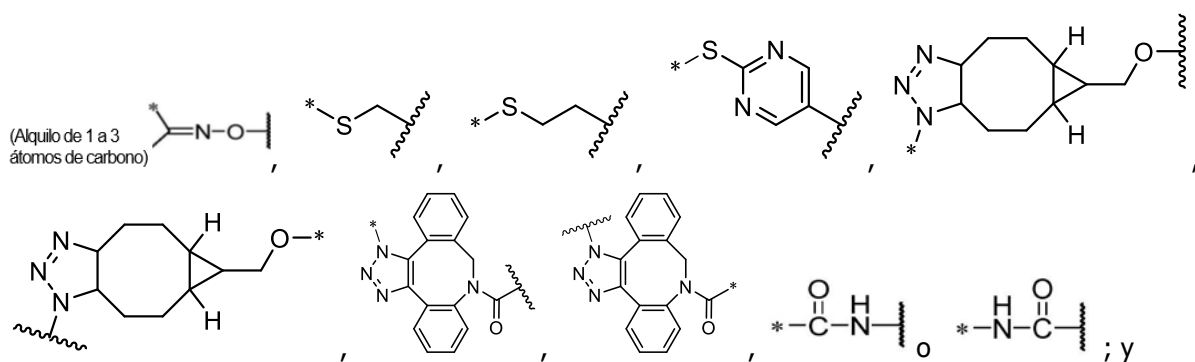
Todas las definiciones descritas sobre la Fórmula (1) aplican a la Fórmula (2), todas las definiciones descritas en la presente sobre la Fórmula (1-1) aplican a la fórmula (2-1), todas las definiciones descritas en la presente acerca de la Fórmula (1-1-1) aplican a la Fórmula (2-1-1), todas las definiciones descritas en la presente acerca de la Fórmula (1-2) aplican a la Fórmula (2-2), todas las definiciones descritas en la presente sobre la Fórmula (1-2-1) aplican a la Fórmula (2-2-1), todas las definiciones descritas en la presente sobre la Fórmula (1-3) aplican a la fórmula (2-3), y todas las definiciones descritas en la presente sobre la Fórmula (1-3-1) aplican a la Fórmula (2-3-1). Por lo tanto, para Sp, A, Y, T, Z, o, i, h, j, q, X, Y', Z', Y'', Z'' y D en la Fórmula (2), Fórmula (2-1), Fórmula (2-1-1), Fórmula (2-2), Fórmula (2-2-1), Fórmula (2-3) y Fórmula (2-3-1), la descripción en la Fórmula (1) puede ser referida, y no habrá limitaciones adicionales en la presente.

15

En la presente solicitud, M' es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:



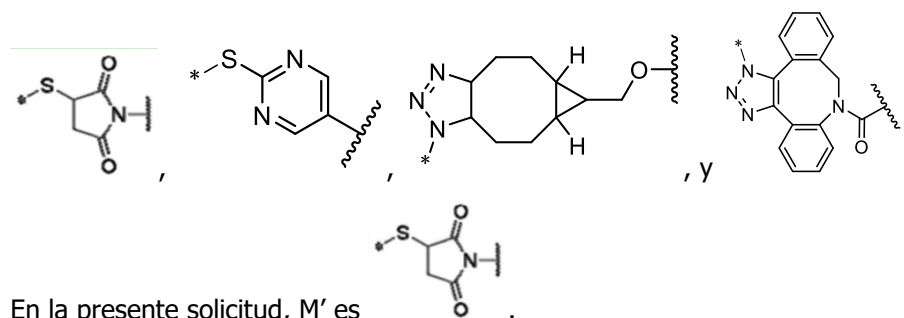
20



* está conectado a Ab.

Además, M' es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:

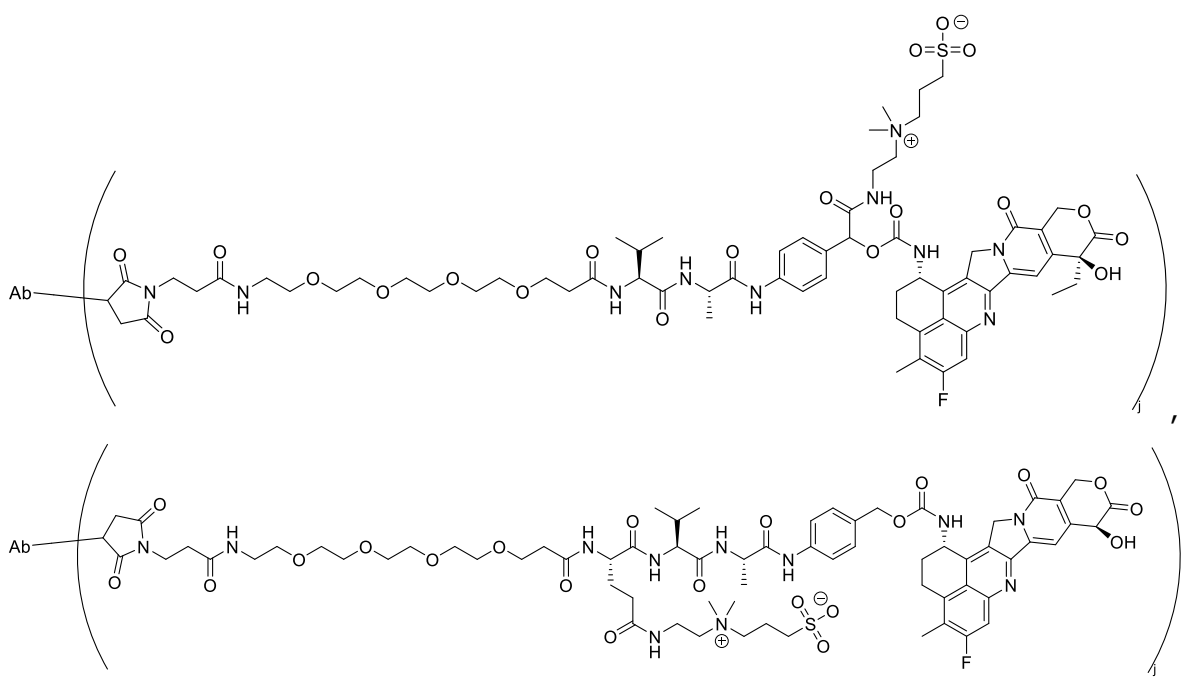
5

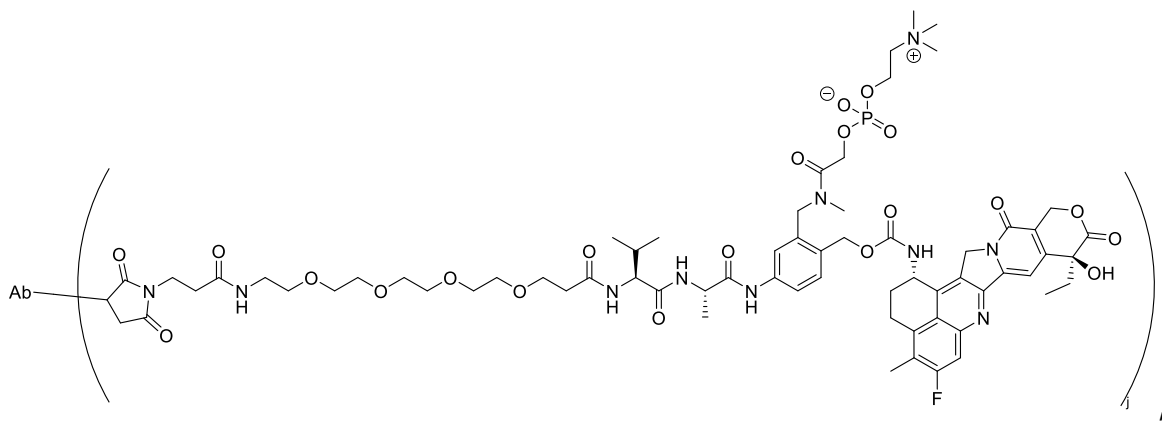
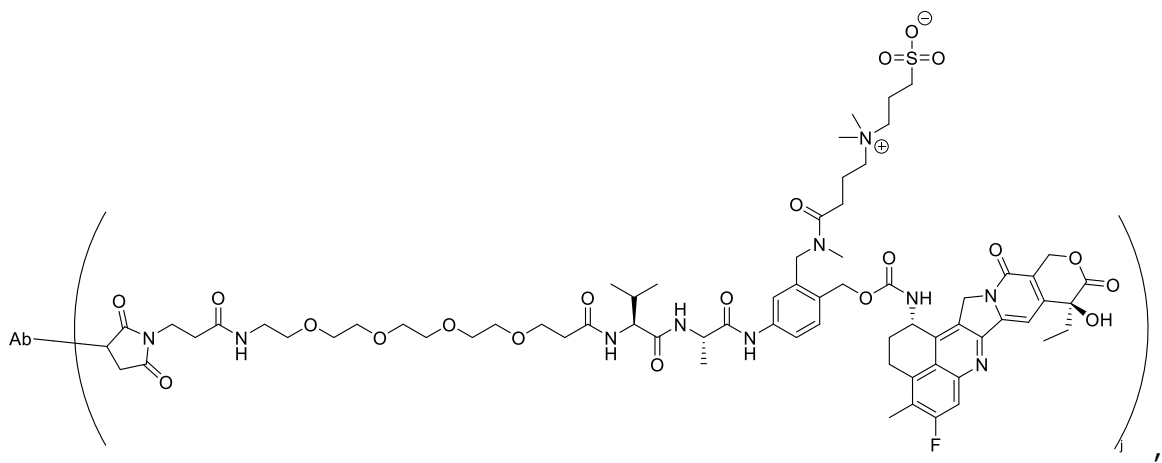
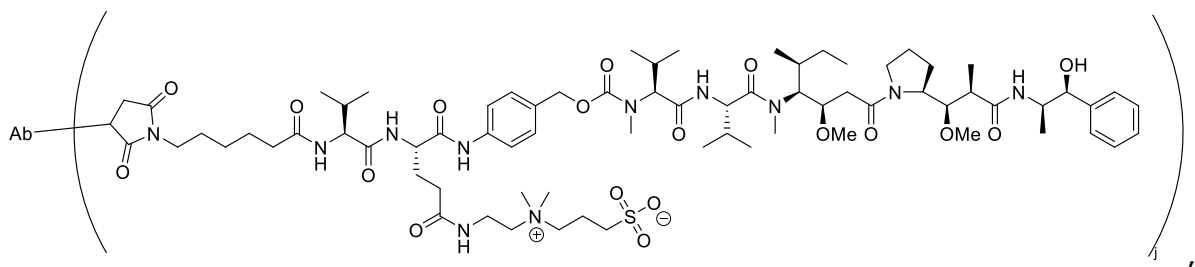
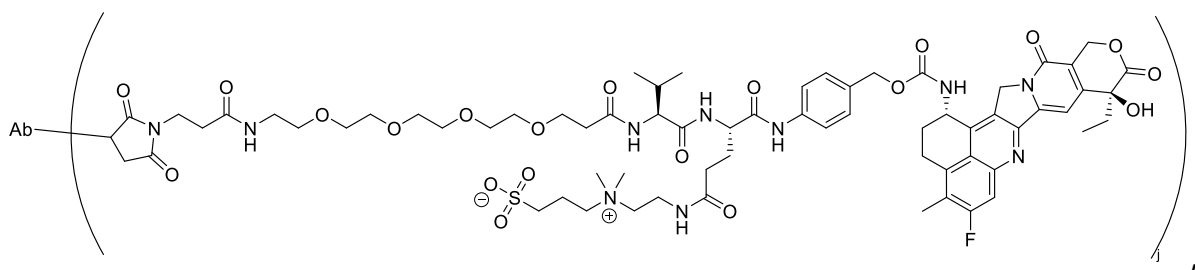


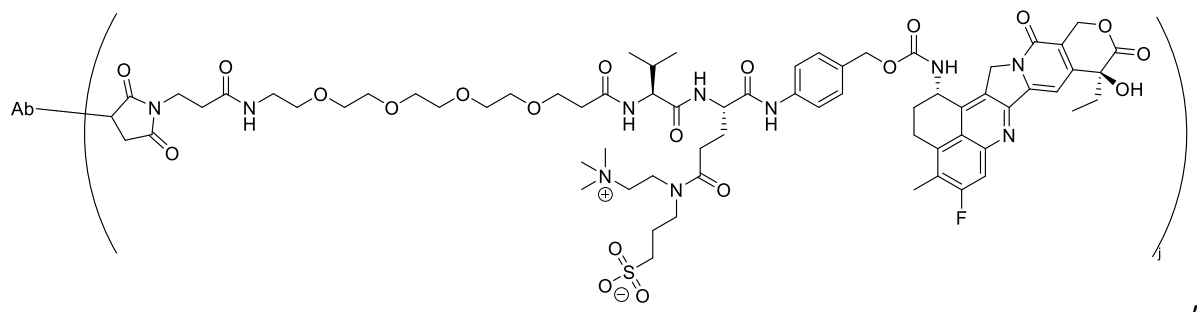
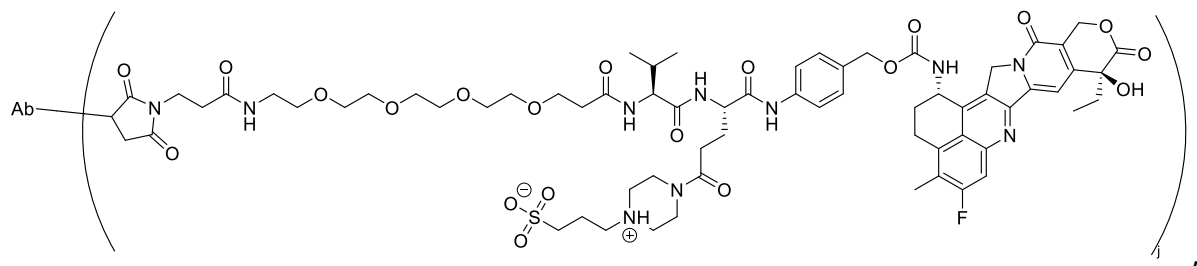
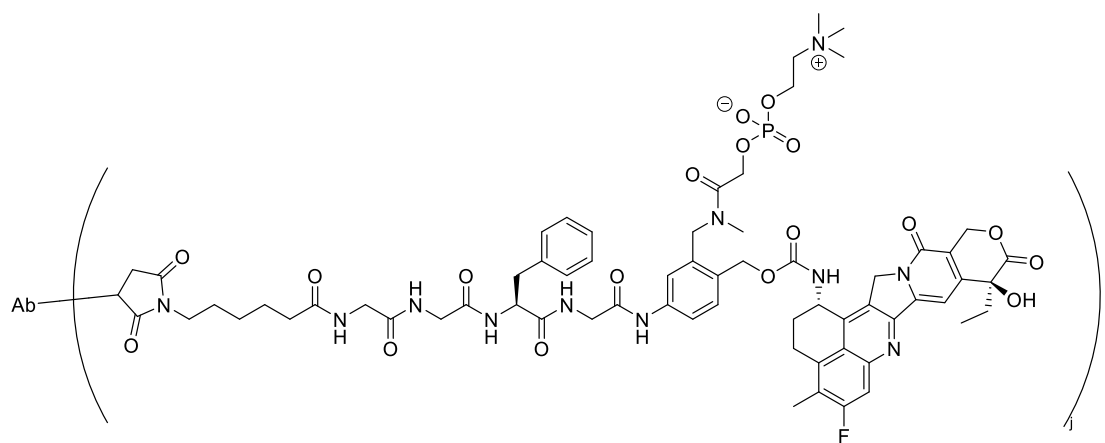
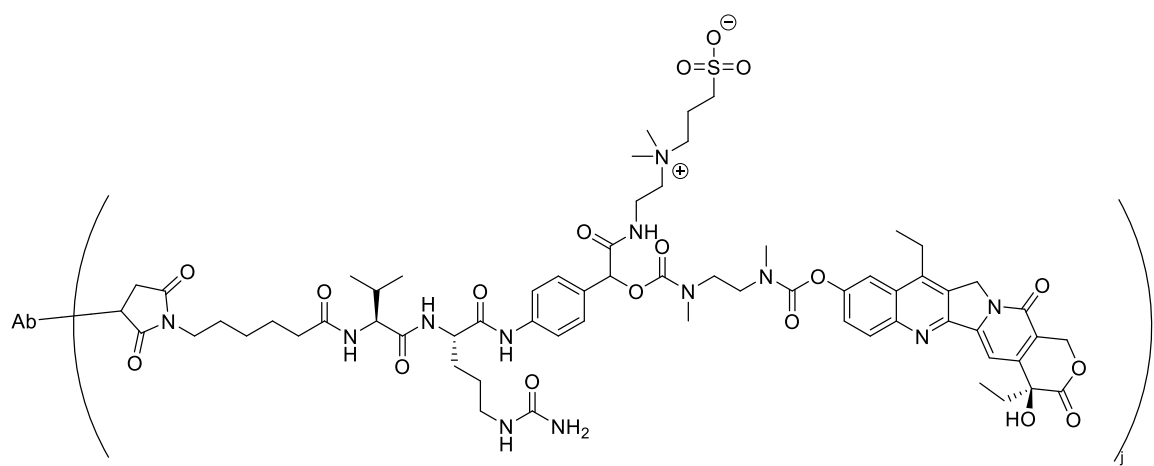
En la presente solicitud, M' es

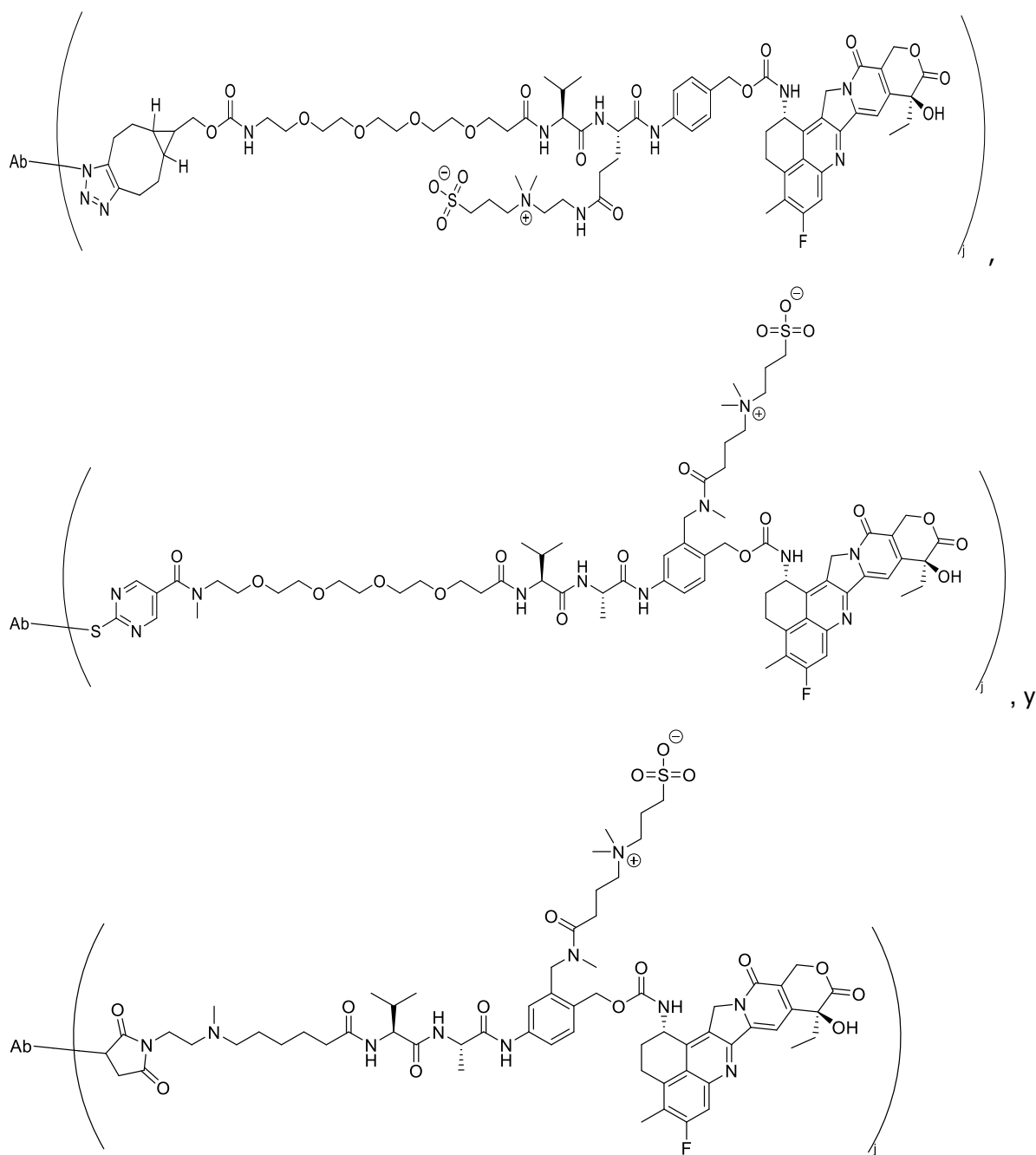
En la presente solicitud, el compuesto es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en:

10









En la presente solicitud, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo derivado de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo completamente humano. En la presente solicitud, el anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal. En la presente solicitud, el anticuerpo comprende un anticuerpo biespecífico. En la presente solicitud, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', fragmento de Fv, F(ab')₂, F(ab)₂, scFv, di-scFv y VHH.

En la presente solicitud, el Ab se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo

anti-Claudin18.2, un anticuerpo anti-receptor de folato humano, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-HER3, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-GPC20, un anticuerpo anti-CDH6, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-EGFRvIII, un anticuerpo anti-AXL, un anticuerpo anti-nectina-4, un anticuerpo anti-factor de tejido, un anticuerpo anti-TIM-1, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-EpCAM, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-STEAP1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-FGF2, un anticuerpo anti-FOLR1, un anticuerpo anti-c-MET, un anticuerpo anti-GFR, un anti-AGS-16, un anticuerpo anti-guanilil ciclasa C, un anticuerpo anti-mesotelina, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-AGS-5, un anticuerpo anti-GPC-3, un anticuerpo anti-c-KIT, un anticuerpo anti-ROR1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CD27L, un anticuerpo anti-5T4, un anticuerpo anti-Mucina 16, un anticuerpo anti-NaPi2b, un anticuerpo anti-STEAP, un anticuerpo anti-SLITRK6, un anticuerpo anti-ETBR, un anticuerpo anti-BCMA, un anticuerpo anti-CEACAM5, un anticuerpo anti-SC-16, un anticuerpo anti-SLC39A6, un anticuerpo anti-proteína 3 similar a Delta, un anticuerpo anti-Claudin18.2, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD37, un anticuerpo anti-CD45, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD66e, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD73, un anticuerpo anti-CD74, un anticuerpo anti-CD79b, un anticuerpo anti-CD138, un anticuerpo anti-CD147, un anticuerpo anti-CD166, un anticuerpo anti-CD223, un anticuerpo anti-MUC16, un anticuerpo anti-MSLN, un anticuerpo anti-ENPP3, un anticuerpo anti-SLITRK6, un anticuerpo anti-FGFR, un anticuerpo anti-LIV-1, un anticuerpo anti-Lewis Y, un anticuerpo anti-integrina av, un anticuerpo anti-ASCT2, un anticuerpo anti-C4.4a, un anticuerpo anti-CA-IX, un anticuerpo anti-CD324, un anticuerpo anti-CD352, un anticuerpo anti-CD44v6, un anticuerpo anti-CD48a, un anticuerpo anti-CLL-1, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-CS1, un anticuerpo anti-DPEP3, un anticuerpo anti-efrina-A2, un anticuerpo anti-efrina-A4, un anticuerpo anti-ETBR, un anticuerpo anti-FGFR2, un anticuerpo anti-FGFR3, un anticuerpo anti-FLT3, un anticuerpo anti-GD3, un anticuerpo anti-GloboH, un anticuerpo anti-GPC3, un anticuerpo anti-LAMP-1, un anticuerpo anti-LRRC15, un anticuerpo anti-Ly6E, un anticuerpo anti-MFI2, un anticuerpo anti-NOTCH3, un anticuerpo anti-p-cadherina, un anticuerpo anti-PRLR y un anticuerpo anti-RNF43, y fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anteriores.

En la presente solicitud, la cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del Ab comprenden la cadena pesada HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo, respectivamente.

En la presente solicitud, la región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) del Ab comprenden la región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo, respectivamente. En la presente solicitud, la cadena pesada y cadena ligera del Ab comprenden la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo, respectivamente.

En la presente solicitud, el Ab es un anticuerpo anti-Claudin18.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En la presente solicitud, el Ab es un anticuerpo anti-receptor de folato humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La presente solicitud también proporciona una composición farmacéutica, en donde
5 comprende el compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo como se describe anteriormente.

La presente solicitud también proporciona el uso del compuesto, o un tautómero, mesómero, racimo, enantiómero o diastereómero del mismo, o mezcla de los mismos, o una sal,
10 profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo como se describe anteriormente, en la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir un tumor.

En la presente solicitud, el tumor es un tumor asociado con un objetivo seleccionado del grupo que consiste en: Claudin18.2, receptor de folato humano, HER2, HER3, TROP2, B7-H3, GPC20, CDH6, EGFR, EGFRvIII, AXL, Nectina-4, factor de tejido, TIM-1, PSMA, EpCAM, MUC1, STEAP1,
15 GPNMB, FGF2, FOLR1, c-MET, GFR, AGS-16, Guanilil ciclasa C, Mesotelina, SLC44A4, EphA2, AGS-5, GPC-3, c-KIT, ROR1, PD-L1, CD27L, 5T4, Mucina 16, NaPi2b, STEAP, SLITRK6, ETBR, BCMA, CEACAM5, SC-16, SLC39A6, proteína 3 similar a delta, Claudin18.2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD45, CD56, CD66e, CD70, CD73, CD74, CD79b, CD138, CD147, CD166, CD223, MUC16, MSLN, ENPP3, SLTRK6, FGFR, LIV-1, Lewis Y, integrina av, ASCT2, C4.4a, CA-IX, CD324, CD352, CD44v6,
20 CD48a, CLL-1, Cripto, CS1, DPEP3, Efrina-A2, Efrina-A4, ETBR, FGFR2, FGFR3, FLT3, GD3, Globo H, GPC3, LAMP-1, LRRC15, Ly6E, MFI2, NOTCH3, p-cadherina, PRLR y RNF43.

En la presente solicitud, el tumor asociado con los objetivos comprende un tumor que tiene alta expresión de los objetivos y/o un tumor con objetivos positivos.

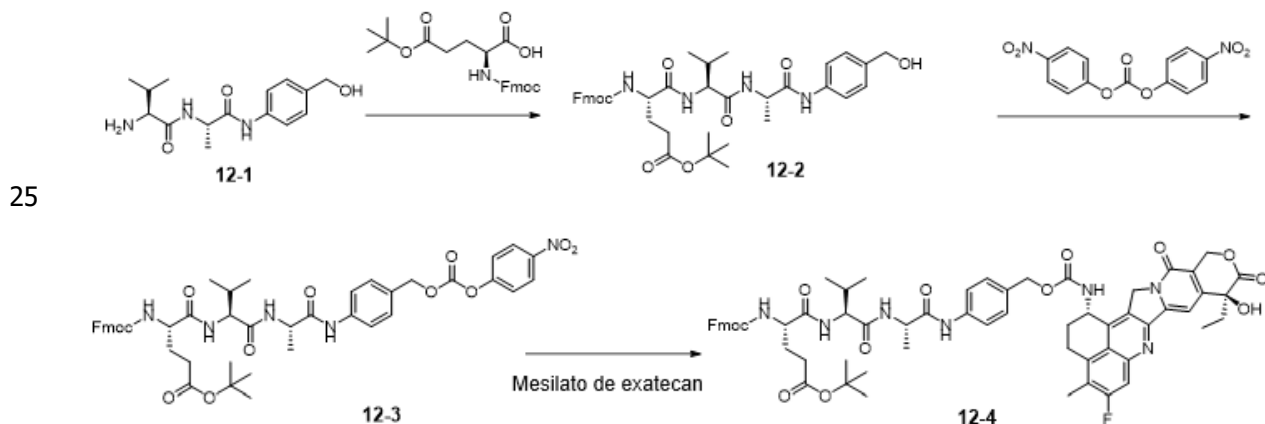
En la presente solicitud, el tumor se selecciona del grupo que consiste en: un tumor
25 sólido, un tumor hematológico, y lesión de cáncer metastásica, refractaria o recurrente.

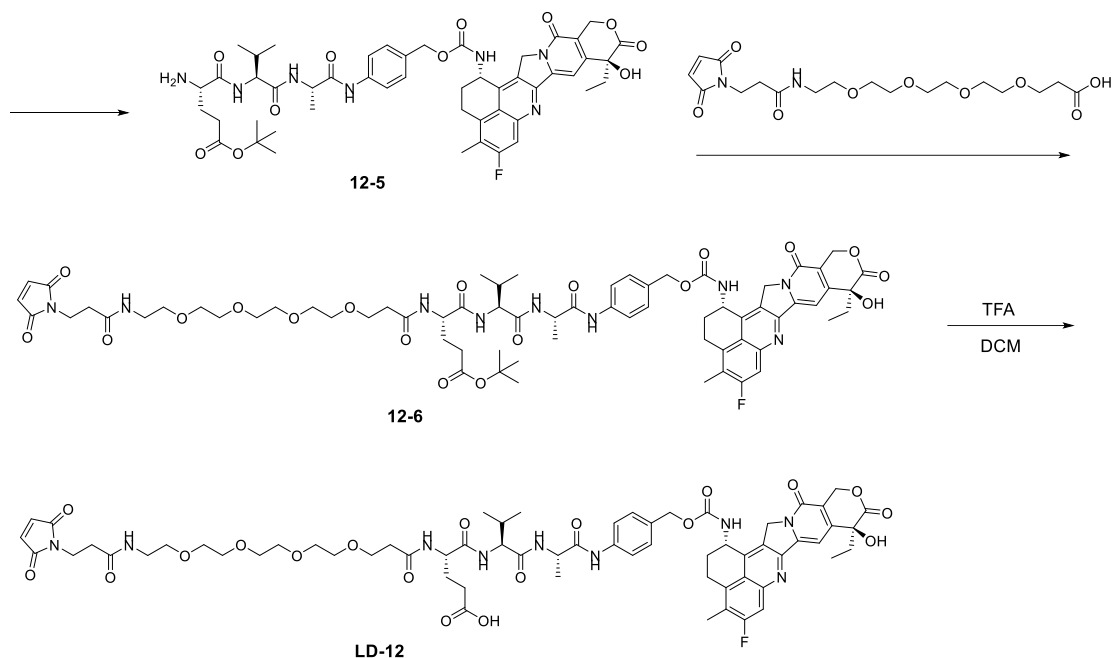
En la presente solicitud, el tumor se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de hígado, cáncer de estómago, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de la unión gastroesofágica (GEJ),
30 cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de células germinales, cáncer de huesos, cáncer de piel, cáncer de timo, cáncer de vías biliares, cáncer de vesícula biliar, melanoma, mesotelioma, linfoma, mieloma (tal como mieloma múltiple), sarcoma, glioblastoma y leucemia.

5 Todos los materiales, reactivos, etc., usados en los siguientes Ejemplos están disponibles comercialmente, a menos que se especifique lo contrario.

En los siguientes Ejemplos, todos los reactivos que se enumeran a continuación están disponibles comercialmente: Fmoc-L-ácido glutámico-5-terc-butil éster, compuesto 12-1, HATU (hexafluorofosfato de 2-(7-azabenzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametilurea), DIEA (N,N-diisopropiletilamina), carbonato de di-(p-nitrobenceno), mesulfonato de exatecán, Mal-amido-PEG4-ácido (ácido maleimida-PEG4-propiónico), DCM (diclorometano), TFA (ácido trifluoroacético), ácido 6-maleimido-hexanoico, Fmoc-L-valil-L-alanina, carbonato de di-(p-nitrofenilo), Fmoc-L-ácido glutámico-5-terc-butil éster, alcohol 4-aminobencílico, Fmoc-L-valina, MMAE (monometil auristatina E), HOBT (1-hidroxibenzotriazol), éter metil tert-butilo, compuesto 65-1, BH₃·Me₂S, DMAP (4-dimetilaminopiridina), (BOC)₂O, EA (acrilato de etilo), TBAF (fluoruro de tetra-n-butilamonio), EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina), compuesto 71-1, 6-(maleimida) succinimida adipato, compuesto 72-1, HOSu (N-hidroxisuccinimida), EDCI (carbodiimida), Fmoc-glicina, cloroformiato de nitrofenilo, compuesto 73-1, BCN-PEG4-ácido (rel-1-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azanadecano-19-ácido)), Fmoc-NMe-PEG4-C2-ácido, N,N-diisopropiletilamina, ácido 4-metilsulfonilbenzoico, DIPEA (N,N-diisopropiletilamina), anhídrido externo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftálico y N-Boc-N-metiletilendiamina.

El esquema sintético de LD-12 es como a continuación:





Síntesis de 12-2

Éster de Fmoc-L-ácido glutámico-5-terc-butilo (600 mg, 1.41 mmol) y compuesto 12-1 (414 mg, 1.41 mmol) se disolvieron en 18 mL de DMF anhidro, agregando HATU (644 mg, 1.69 mmol), y DIEA (365 mg, 2.82 mmol) para agitar continuamente durante 18 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener 0.9 g de un producto crudo.

Síntesis de 12-3

El compuesto 12-2 (300 mg, 0.43 mmol), carbonato de bis(p-nitrofenilo) (261 mg, 0.86 mmol) y DIEA (166 mg, 1.28 mmol) se disolvieron en 4 mL de DMF anhidro para agitar durante 18 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar placa de TLC de capa delgada (MeOH/DCM, 0% a 3%) para obtener 0.3 g de un producto final. MS+Na(+)=889.4.

Síntesis de 12-4

El compuesto 12-3 (350 mg, 0.425 mmol), DIEA (207 mg, 1.61 mmol) y mesilato de exatecan (600 mg, 0.69 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro para reaccionar durante 6 horas a temperatura ambiente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se

combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 470 mg de un producto final. MS (+)1162.4.

5 Síntesis de 12-5

El compuesto 12-4 (100 mg, 0.086 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando piperidina (0.05 mL) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, después de concentración a presión reducida, batir con metilo terc-butil éter y filtrar para obtener 80 mg de un producto crudo, que se usó directamente para la siguiente reacción. MS (+)940.4.

10 Síntesis de 12-6

El compuesto 12-5 (46 mg, 0.11 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando HATU (48.5 mg, 0.13 mmol) para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, entonces agregar ácido Mal-amido-PEG4 (80 mg, 0.085 mmol) y DIEA (33 mg, 0.26 mmol) en secuencia para agitar continuamente durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la
15 reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar placa de TLC de capa delgada (MeOH/DCM, 0% a 3%) para obtener 30 mg de un producto final. MS (+)1339.2.

20 Síntesis de LD-12

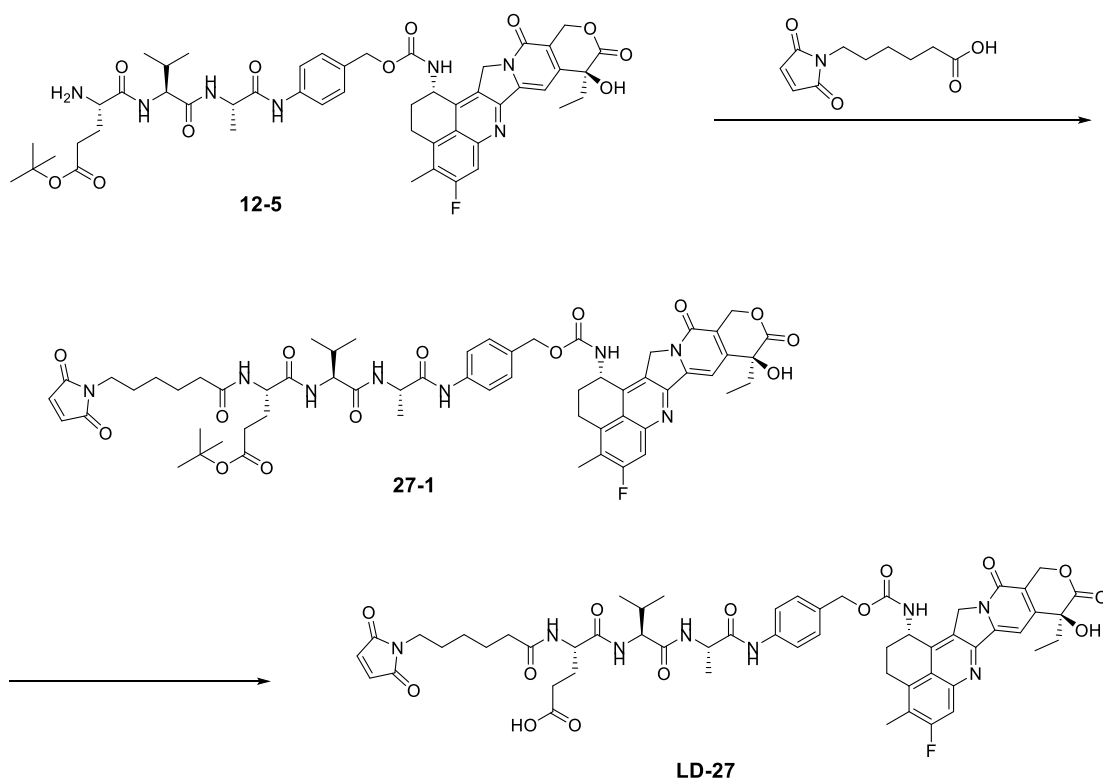
El compuesto 12-6 (30 mg, 0.022 mmol) se disolvió en 2 mL de DCM, agregando 0.3 mL de TFA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de concentración bajo presión reducida, se realizó preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 0.1% de ácido fórmico) para obtener 7.7 mg de un producto.

25 LCMS:m/z(ES+)(M+H)+=1282.4, Rt=1.385 min

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.00 (s, 1H), 8.23 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.11-8.03 (m, 3H), 7.79 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.55 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.36-5.25 (m, 3H), 5.09 (s, 2H), 4.41-4.32 (m, 2H), 4.23-4.17 (m, 1H), 3.60 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.50-3.49 (m, 16H), 3.37-3.33 (m, 2H), 3.16-3.14 (m, 2H), 2.45-2.32 (m, 7H), 2.27-2.10 (m, 4H), 2.01-1.96 (m, 1H), 1.96-1.81 (m, 3H), 1.74 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 1.31 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.91-0.83 (m, 9H).
30

Ejemplo 2 (Preparación de LD-27)

El flujo de proceso para preparación de LD-27 es como a continuación:



Síntesis de 27-1

El compuesto 12-5 (127.34 mg, 0.306 mmol, síntesis de compuesto 12-5 se refieren al Ejemplo 1) y ácido 6-maleimidoheptanoico (80 mg, 0.085 mmol) se disolvieron en 4 mL de DMF anhidro, agregando HATU (49 mg, 0.128 mmol) y DIEA (22 mg, 0.170 mmol) para agitar continuamente durante 3 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener 80 mg de un producto crudo. MS(+)=1133.4.

Síntesis de LD-27

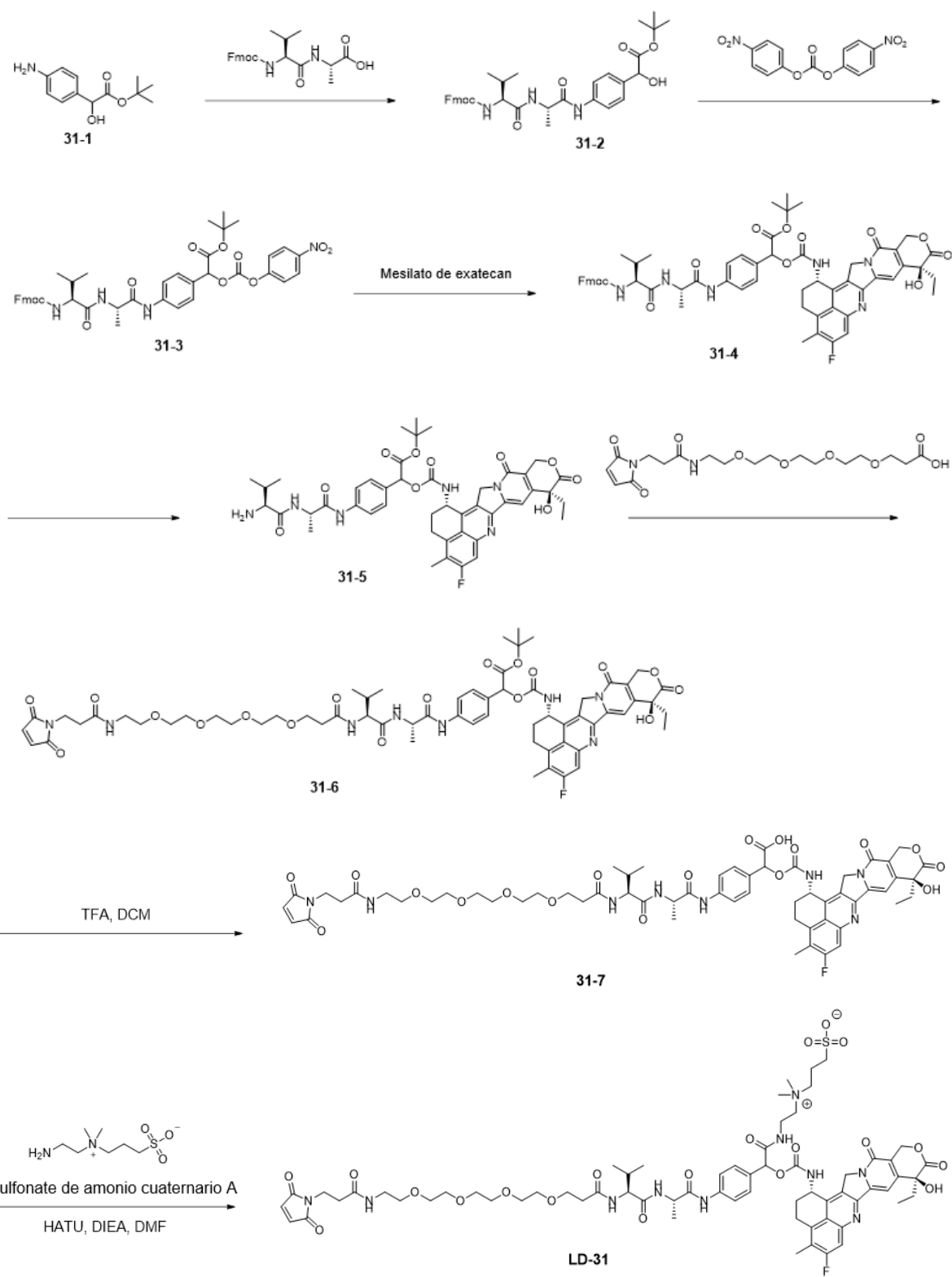
El Compuesto 27-1 (70 mg, 0.062 mmol) se disolvió en 5 mL de DCM, agregando 0.8 mL de TFA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de concentración bajo presión reducida, se realizó preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 0.1% de ácido fórmico) para obtener 22.8 mg de un producto.

LCMS:m/z(ES+)(M+H)+=1077.4, Rt=1.454 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.08 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.21 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.06-7.98 (m, 2H), 7.77 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.65-7.57 (m, 3H), 7.44 – 7.26 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.28 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.42 – 4.15 (m, 3H), 3.26-3.08 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.29 – 1.63 (m, 12H), 1.51-1.42 (m, 4H), 1.36 – 1.12 (m, 6H), 0.89-0.81 (m, 9H).

Ejemplo 3 (Preparación de LD-31)

El esquema sintético de LD-31 es como a continuación:



Síntesis de 31-2

Fmoc-L-valil-L-alanina (220 mg, 0.54 mmol) se disolvió en 5 mL de DMF anhidro, agregando HATU (244.5 mg, 0.643 mmol) y DIEA (138.5 mg, 1.07 mmol) para agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, entonces el compuesto 31-1 (119.67 mg, 0.536 mmol, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método sintético, que hace referencia a WO2022058548A1) se agregó en la solución de reacción para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. La detección de LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de la concentración, se obtuvo un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 320 mg de un producto final. MS+Na (+)=638.4.

Síntesis de 31-3

El Compuesto 31-2 (320 mg, 0.520 mmol) se disolvió en 5 mL de DCM, agregando sucesivamente carbonato de bis(p-nitrofenilo) (474.30 mg, 1.559 mmol) y DIEA (0.344 mL, 2.079 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. La detección de LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar solución salina saturada y extraer con acetato de etilo, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, entonces se filtró. Después de la concentración, se obtuvo un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 340 mg de un producto final. MS+Na (+)=803.2.

Síntesis de 31-4

El Compuesto 31-3 (340 mg, 0.462 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando mesilato de exatecan (245.61 mg, 0.666 mmol), DIEA (119.43 mg, 0.924 mmol) y DMAP (5.65 mg, 122.17 mmol) sucesivamente para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección de LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar solución salina saturada, se precipitó un producto crudo sólido, batir con metilo terc-butil éter para obtener 157 mg del compuesto 31-4, MS(+)=1078.2.

Síntesis de 31-5

El Compuesto 31-4 (440 mg, 0.408 mmol) se disolvió en 4 mL de DMF anhidro, agregando piperidina (69.56 mg) en la solución de reacción para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la concentración, se obtuvieron 292 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)= 855.2.

Síntesis de 31-6

El Compuesto 31-5 (142.23 mg, 0.342 mmol) y ácido Mal-amido-PEG4 (292 mg, 0.342 mmol) se disolvieron en 4 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (88.28 mg, 0.683 mmol) y HATU (155.84 mg, 0.410 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar solución salina saturada, se precipitó un

producto crudo sólido, batir con metilo terc-butil éter para obtener 350 mg de un producto crudo. MS (+)=1254.4.

Síntesis de 31-7

El Compuesto 31-6 (90 mg de un producto crudo) se disolvió en 2.5 mL de DMF anhidro, agregando TFA (0.5 mL) en la solución de reacción para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la concentración, se obtuvieron 80 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)=1198.4.

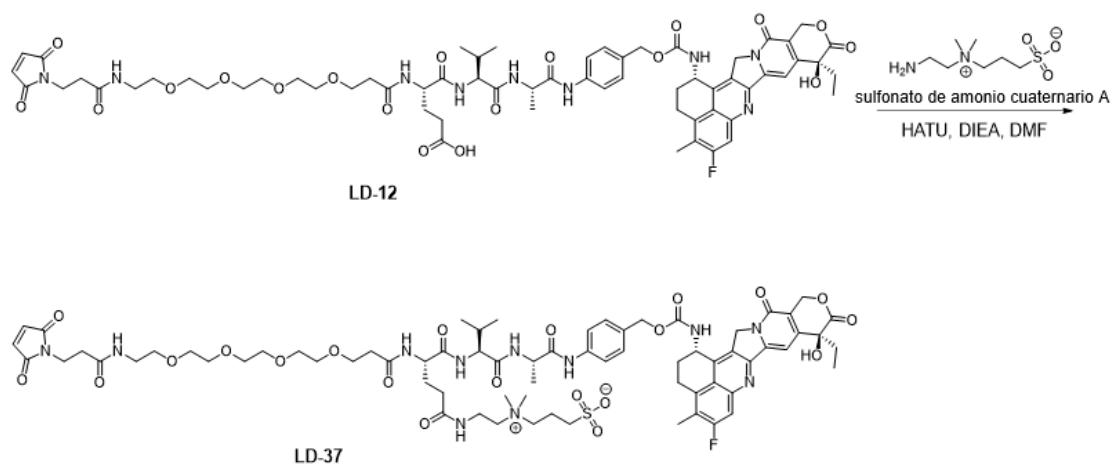
Síntesis de LD-31

El Compuesto 31-7 (76.62 mg, 0.064 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (16.54 mg, 0.128 mmol) y HATU (29.20 mg, 0.077 mmol) para agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, entonces agregar sulfato de amonio cuaternario A (14.81 mg, 0.070 mmol, CAS#: 78276-19-4, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método sintético, que hace referencia a WO2011146595A2) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó preparación de fase inversa (ácido fórmico) para obtener LD-31 como sólido blanco (P1:12.5 mg, P2:11.3 mg).

LCMS: m/z (ES+) (M+H)+ = 1390.6, Rt = 1.242 min (P1), 1.279 min (P2).

Ejemplo 4 (Preparación de LD-37)

El esquema sintético de LD-37 es como a continuación:



Síntesis de LD-37

El Compuesto LD-12 (49 mg, 0.038 mmol, síntesis de LD-12 se refieren al Ejemplo 1) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (9.88 mg, 0.076 mmol) y HATU (17.43 mg,

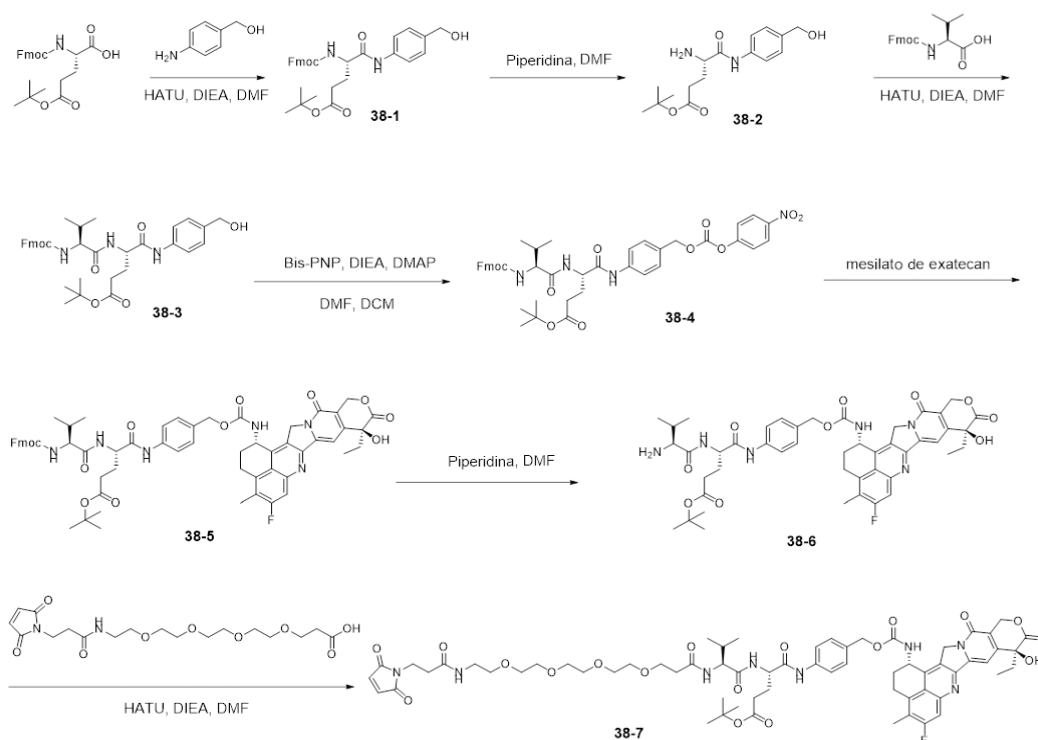
0.046 mmol) para agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, agregar sulfato de amonio cuaternario A (8.04 mg, 0.038 mmol, CAS#: 78276-19-4, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método sintético, que hace referencia a WO2011146595A2) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. La preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 0.1% de ácido fórmico) se realizó para obtener LD-37 como sólido blanco (7.35 mg 13.04% de rendimiento).

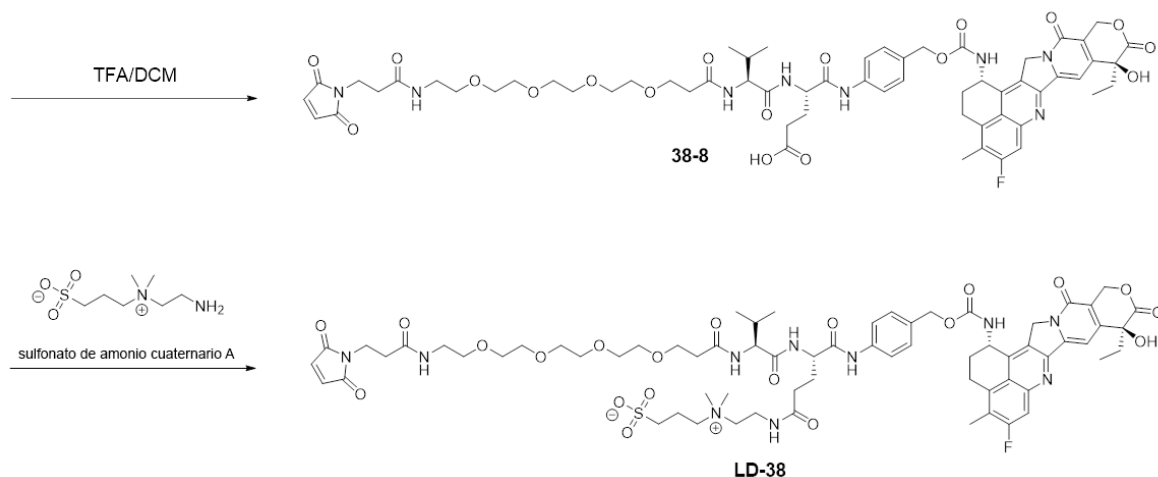
LCMS: m/z (ES+) ($M+H$)⁺ = 1475.6, R_t = 1.344 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.03 (s, 1H), 8.24 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.16 – 8.07 (m, 3H), 8.03 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.47 (s, 2H), 5.31 (s, 3H), 5.10 (s, 2H), 4.41 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.24 – 4.20 (m, 1H), 3.61 (t, J = 7.2 Hz, 5H), 3.46–3.51 (m, 16H), 3.16 (dd, J = 11.2, 5.6 Hz, 4H), 3.05 (s, 6H), 2.69 (s, 3H), 2.40 (s, 4H), 2.35 (s, 6H), 2.18 (s, 4H), 2.01 (s, 2H), 1.90 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 1.79 – 1.69 (m, 1H), 1.32 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

Ejemplo 5 (Preparación de LD-38)

El esquema sintético de LD-38 es como a continuación:





Síntesis de 38-1

Éster de Fmoc-L-ácido glutámico-5-terc-butilo (144.7 mg, 1.175 mmol) y alcohol 4-aminobencílico (500 mg, 1.175 mmol) se disolvieron en 3 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (303.7 mg, 2.350 mmol) y HATU (536.19 mg, 1.410 mmol) para agitar durante 16 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar a columna de gel de sílice de fase normal (EA/PE, 0% a 45%) para obtener 530 mg de un producto final. MS(+)=475.2.

Síntesis de 38-2

El Compuesto 38-1 (530 mg, 0.999 mmol) se disolvió en 3 mL de DMF anhidro, agregando piperidina (0.2 mL) en la solución de reacción para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la concentración, se obtuvieron 600 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)=309.2.

Síntesis de 38-3

El Compuesto 38-2 (600 mg de un producto crudo) y Fmoc-L-valina (500 mg, 1.175 mmol) se disolvió en 3 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (334.13 mg, 2.585 mmol) y HATU (589.82 mg, 1.551 mmol) para agitar durante 16 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (EA/PE, 40% a 60%) para obtener 450 mg de un producto final. MS(+)=630.4.

Síntesis de 38-4

El Compuesto 38-3 (450 mg, 0.715 mmol) se disolvió en 1 mL de DCM anhidro y 4 mL de DMF anhidro, agregando carbonato de bis(p-nitrofenilo) (869.5 mg, 2.858 mmol) y 0.354 mL de DIEA sucesivamente para reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de
5 agregar agua en la solución de reacción y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (EA/PE, 30% a 70%) para obtener 200 mg de un producto final. MS(+)=543.2.

Síntesis de 38-5

10 El Compuesto 38-4 (100 mg, 0.126 mmol) y mesilato de exatecan (54.78 mg, 0.126 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro, agregando DMAP(0.15 mg, 0.0001 mmol) y DIEA (32.52 mg, 0.252 mmol) sucesivamente para reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de agregar agua en la solución de reacción y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio
15 anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (EA/PE, 30% a 70%) para obtener 100 mg de producto final. MS(+)=1091.4.

Síntesis de 38-6

El Compuesto 38-5 (100 mg, 0.073 mmol) se disolvió en 3 mL de DMF anhidro, agregando piperidina (0.3 mL) en la solución de reacción para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se obtuvieron 110 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente
20 reacción. MS(+)=870.8.

Síntesis de 38-7

El Compuesto 38-6 (110 mg de un producto crudo) y ácido Mal-amido-PEG4 (30.19 mg, 0.073 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (18.74 mg, 0.145 mmol) y HATU (33.08 mg, 0.087 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al
25 usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 5% a 20%) para obtener 90 mg de un producto final. MS(+)=1267.6.

Síntesis de 38-8

El Compuesto 38-7 (90 mg, 0.071 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM anhidro, agregando 0.3 mL TFA en la solución de reacción para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente.
35 Se obtuvieron 80 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción.

MS(+)=2111.4.

Síntesis de LD-38

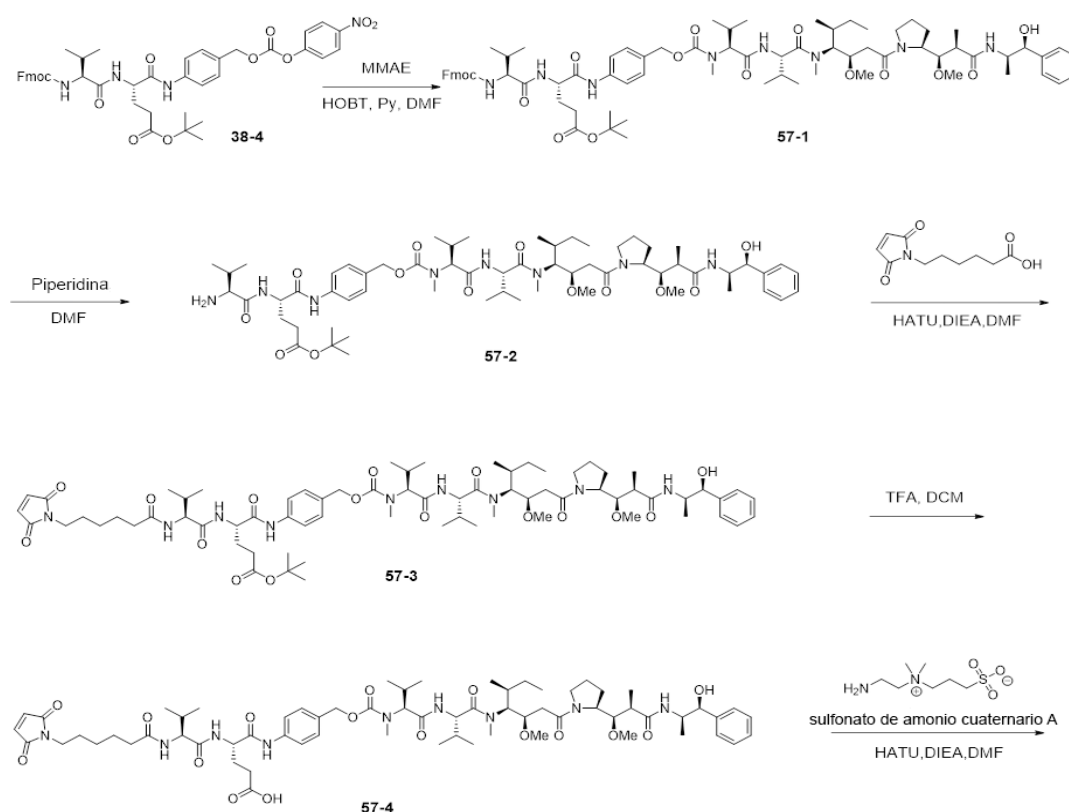
El Compuesto 38-8 (80 mg, producto crudo) y sulfato de amonio cuaternario A (13.89 mg, 0.066 mmol, CAS#: 78276-19-4, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método sintético, que hace referencia a WO2011146595A2) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (17.07 mg, 0.132 mmol) y HATU (30.14 mg, 0.079 mmol) para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. La preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 0.1% de ácido fórmico) se realizó para obtener 13.5 mg como sólido blanco.

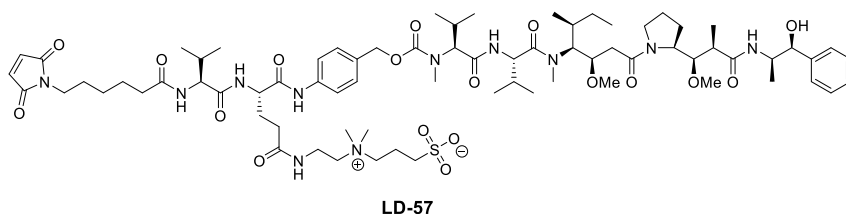
LCMS: m/z (ES+) (M+H)+ = 1404.6, Rt = 1.314 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.89 (s, 1H), 8.18 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.10 – 7.93 (m, 3H), 7.78 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.29 (d, J = 4.0 Hz, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.32 (dd, J = 13.2, 7.6 Hz, 1H), 4.20 – 4.14 (m, 1H), 3.59 (dd, J = 14.8, 7.6 Hz, 6H), 3.40-3.51 (m, 18H), 3.14-3.20 (m, 4H), 3.03 (s, 7H), 2.42 – 2.30 (m, 7H), 2.20-2.31 (m, 4H), 2.03 – 1.82 (m, 8H), 0.87-0.91 (m, 9H).

Ejemplo 6 (Preparación de LD-57)

El esquema sintético de LD-57 es como a continuación:





Síntesis de 57-1

El Compuesto 38-4 (288 mg, 0.363 mmol), el método sintético se refiere al Ejemplo 5) y MMAE (200 mg, 0.279 mmol) se disolvieron en 5 mL de DMF anhidro, agregando piridina (1 mL) y HOBT (59 mg, 0.279 mmol) sucesivamente para reaccionar durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de la concentración, se obtuvo un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 320 mg de un producto final. MS(+)=1374.2.

Síntesis de 57-2

El Compuesto 57-1 (260 mg, 0.189 mmol) se disolvió en 3 mL de DMF anhidro, agregando piperidina (0.05 mL) en la solución de reacción para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, después de la concentración, batir con metilo terc-butil éter para obtener 215 mg de un producto crudo, que se usó directamente para la siguiente reacción. MS(+)=1152.5.

Síntesis de 57-3

El Compuesto 57-2 (215 mg de un producto crudo) y ácido 6-maleimidohexanoico (47.3 mg, 0.224 mmol) se disolvieron en 3 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (0.092 mL, 0.559 mmol) y HATU (142 mg, 0.374 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 170 mg de un producto final. MS(+)=1345.7.

Síntesis de 57-4

El Compuesto 57-3 (150 mg, 0.112 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM anhidro, agregando TFA (0.6 mL) en la solución de reacción para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se obtuvieron 150 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)=1289.5.

Síntesis de LD-57

El Compuesto 57-4 (143 mg, 0.111 mmol) y sulfato de amonio cuaternario A (70 mg, 0.333 mmol, CAS#: 78276-19-4, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método sintético, que hace referencia a WO2011146595A2) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro,

agregando DIEA (0.092 mL, 0.554 mmol) y HATU (126.5 mg, 0.333 mmol) para agitar durante 3 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. La preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 0.1% de ácido fórmico) se realizó para obtener 30 mg de sólido blanco.

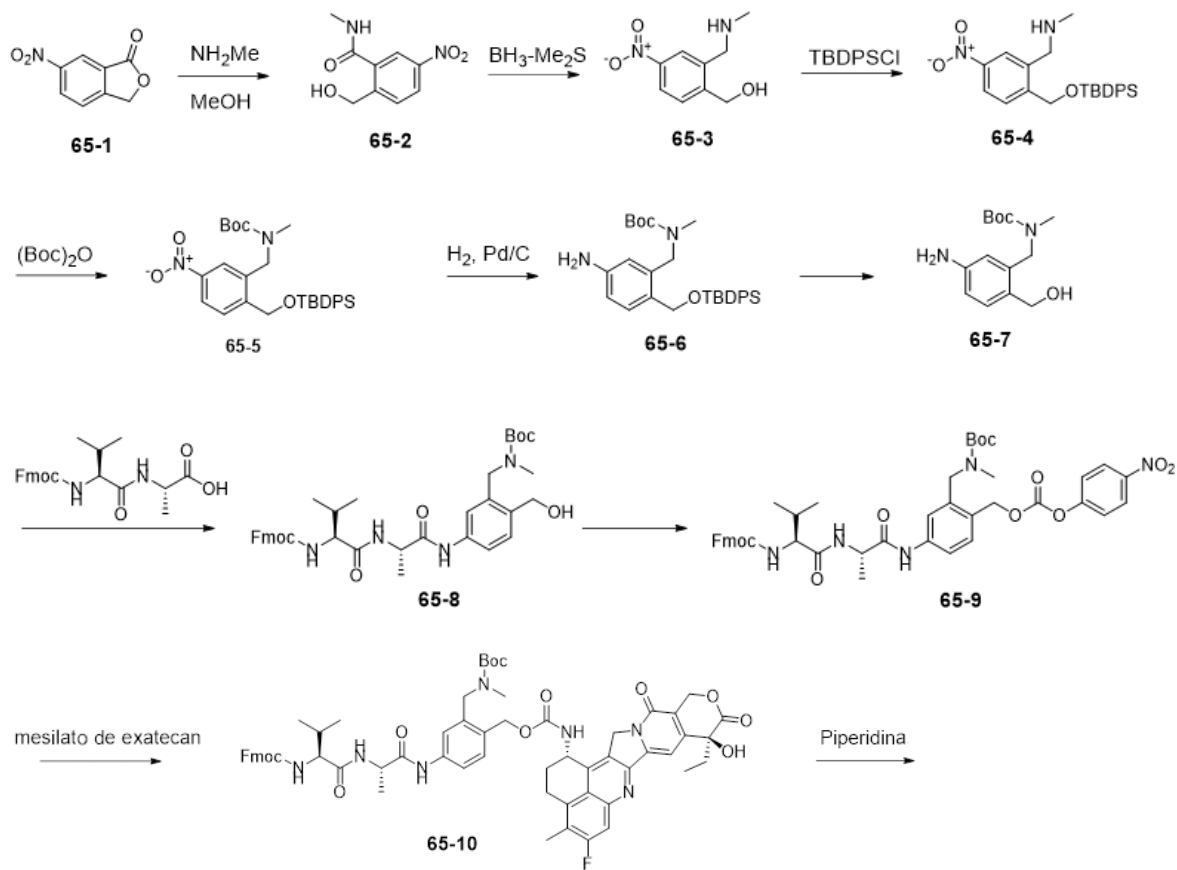
5 LCMS: $m/z(ES^+)(M+H)^+=1481.2$, $R_t=1.475$ min

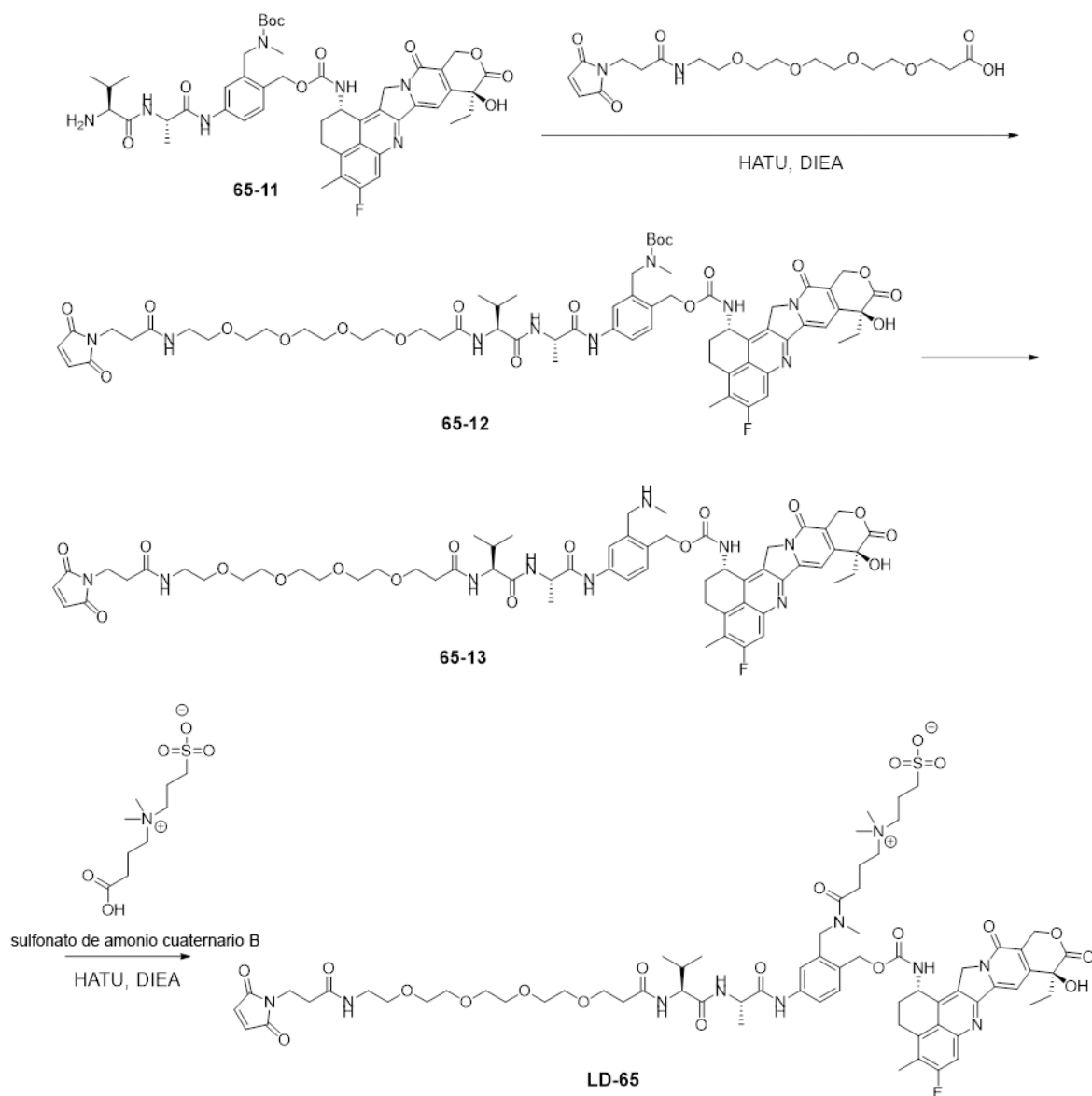
^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.89 (s, 1H), 8.40 – 8.03 (m, 3H), 7.92 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.34 – 7.13 (m, 8H), 7.02 (s, 2H), 5.06–5.10 (m, 3H), 4.85 – 3.92 (m, 10H), 3.63 – 3.43 (m, 9H), 3.30 – 2.97 (m, 18H), 2.89 (d, $J = 14.4$ Hz, 3H), 2.37 – 1.68 (m, 17H), 1.61 – 1.45 (m, 6H), 1.40 – 0.70 (m, 36H).

10

Ejemplo 7 (Preparación de LD-65)

El esquema sintético de LD-67 es como a continuación:





Síntesis de 65-2

El compuesto 65-1 (500 mg, 2.791 mmol) se disolvió en 5 mL de metanol, agregar solución de metilamina metanol (1.73 g, 55.825 mmol) para reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente, entonces se filtró para obtener un producto crudo, lavar con agua dos veces. Después de secado bajo presión reducida, se obtuvieron 550 mg de un producto final. MS(+)211.2.

Síntesis de 65-3

El compuesto 65-2 (500 mg, 2.379 mmol) se disolvió en 50 mL de THF anhidro, agregando $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (457 mg, 5.947 mmol) (10.0 M en THF) lentamente gota a gota bajo baño de hielo para realizar reflujo durante 5 horas. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. 4M HCl (12 mL) solución de metanol se agregó bajo baño de hielo en la solución de reacción, entonces se calentó a 65°C para reaccionar continuamente durante 8 horas, se filtró bajo presión reducida para

obtener 350 mg de un producto crudo. MS(+)197.08.

Síntesis de 65-4

El compuesto 65-3 (350 mg de un producto crudo) e imidazol (485.77 mg, 7.135 mmol) se disolvieron en 5 mL de CMF anhidro, agregando TBDPS-Cl (735.44 mg, 2.676 mmol) para
 5 agitar durante 2 horas a 0°C. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (EA/PE, 10% a 50%) para obtener 710 mg de un producto final. MS(+)435.20.

10 Síntesis de 65-5

El Compuesto 64-4 (1.5 g, 3.451 mmol) y DMAP (0.21 g, 1.726 mmol) se disolvieron en DCM (20 mL), agregando (BOC)₂O (1.51 g, 6.903 mmol) para agitar durante 2 horas. Después de
 15 agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (EA/PE, 10% a 50%) para obtener 1.87 g de un producto final. MS+Na(+) 557.3.

Síntesis de 65-6

El compuesto 65-5 (1.7 g, 3.179 mmol) y Pd/C 5% (0.15 g, 1.410 mmol) se disolvieron en EA (30 mL), agitando la solución de reacción durante 16 horas bajo atmósfera de
 20 hidrógeno, se filtraron y centrifugaron para obtener 1.7 g de un producto final. MS+Na(+)527.6.

Síntesis de 65-7

El compuesto 65-6 (350 mg, 0.693 mmol) se disolvió en THF anhidro (4 mL), agregando TBAF (1.387 mL, 1.387 mmol) para agitar durante 4 horas a temperatura ambiente. La
 25 solución de reacción se centrifugó, y se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 170 mg de un producto final. MS+Na(+) = 289.2.

Síntesis de 65-8

El compuesto 65-7 (170 mg, 0.638 mmol), Fmoc-L-valil-L-alanina (392.99 mg, 0.957 mmol) y EEDQ (236.48 mg, 0.957 mmol) se disolvieron en 2 mL de DCM y 1 mL de metanol para
 30 agitar durante 16 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción se centrifugó, y se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 367 mg de un producto final. MS(+)Na(+) = 681.4.

Síntesis de 65-9

El compuesto 65-9 (367 mg, 0.557 mmol), carbonato de bis(p-nitrofenilo) (224.57 mg, 1.114 mmol) y piridina (0.090 mL, 1.114 mmol) se disolvieron en 5 mL de THF para agitar
 35 durante 16 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente.

Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 380 mg de un producto final. MS(+)+Na(+)=846.4.

5 Síntesis de 65-10

El compuesto 65-9 (350 mg, 0.425 mmol), DMAP (5.19 mg, 0.043 mmol) y mesilato de exatecan (248.50 mg, 0.468 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro para reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 350 mg de un producto final. MS(+)=1120.6.

Síntesis de 65-11

15 El compuesto 65-10 (350 mg, 0.312 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando piridina (0.05 mL) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de concentración bajo presión reducida, se obtuvieron 380 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)=898.41.

Síntesis de 65-12

20 El compuesto 65-11 (127.34 mg, 0.306 mmol) se disolvió en 3 mL de DMF anhidro, agregando HATU (116.28 mg, 0.306 mmol) para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, entonces agregar ácido Mal-amido-PEG4 (250 mg, 0.278 mmol) y DIEA (3 mL) sucesivamente para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces
25 filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 185 mg de un producto final. MS (+)=1296.6.

Síntesis de 65-13

30 El compuesto 65-12 (40 mg, 0.031 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM, agregando 0.6 mL de TFA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de concentración bajo presión reducida, se obtuvieron 37 mg de un producto final. MS+Na(+)=1218.6.

Síntesis de LD-65

35 Sulfato de amonio cuaternario B (37 mg, 0.031 mmol, CAS#: 1349808-80-5, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método sintético, que hace

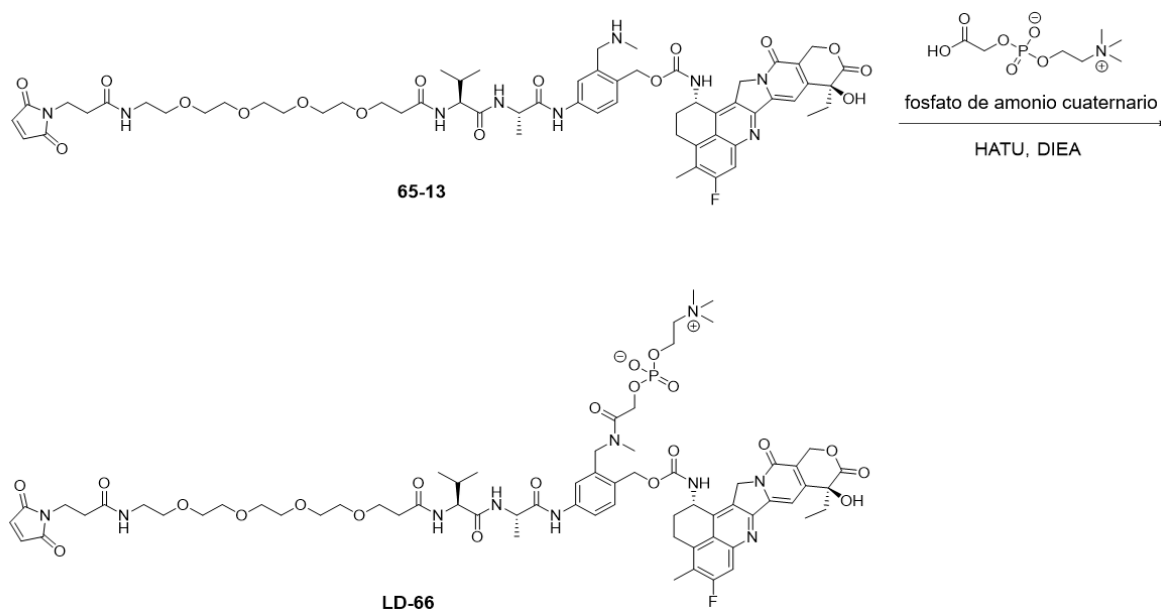
referencia a WO2011146595A2) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando HATU (12.94 mg, 0.034 mmol) para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, entonces agregar compuesto 65-13 (11.75 mg, 0.046 mmol) y DIEA (0.008 mL, 0.046 mmol) sucesivamente para agitar continuamente durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Se realizó preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 10 mM NH₄OAc) para obtener 5.2 mg de sólido blanco.

LCMS: m/z (ES+) (M+H)⁺ = 1432.6, Rt = 1.285 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.2-9.9 (m, 1H), 8.19 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 8.12 – 8.00 (m, 2H), 7.90 – 7.85 (m, 1H), 7.78 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.39 – 7.30 (m, 3H), 7.00 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 5.29 (s, 4H), 5.12 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 4.64-4.70 (m, 2H), 4.39 – 4.34 (m, 1H), 4.22 – 4.17 (m, 1H), 3.48-3.47 (m, 16H), 3.04-2.86 (m, 14H), 2.39 – 2.30 (m, 11H), 2.03 – 1.85 (m, 10H), 1.29-1.30 (m, 3H), 0.897-0.817 (m, 9H).

Ejemplo 8 (Preparación de LD-66)

El esquema sintético de LD-66 es como a continuación:



Síntesis de LD-66

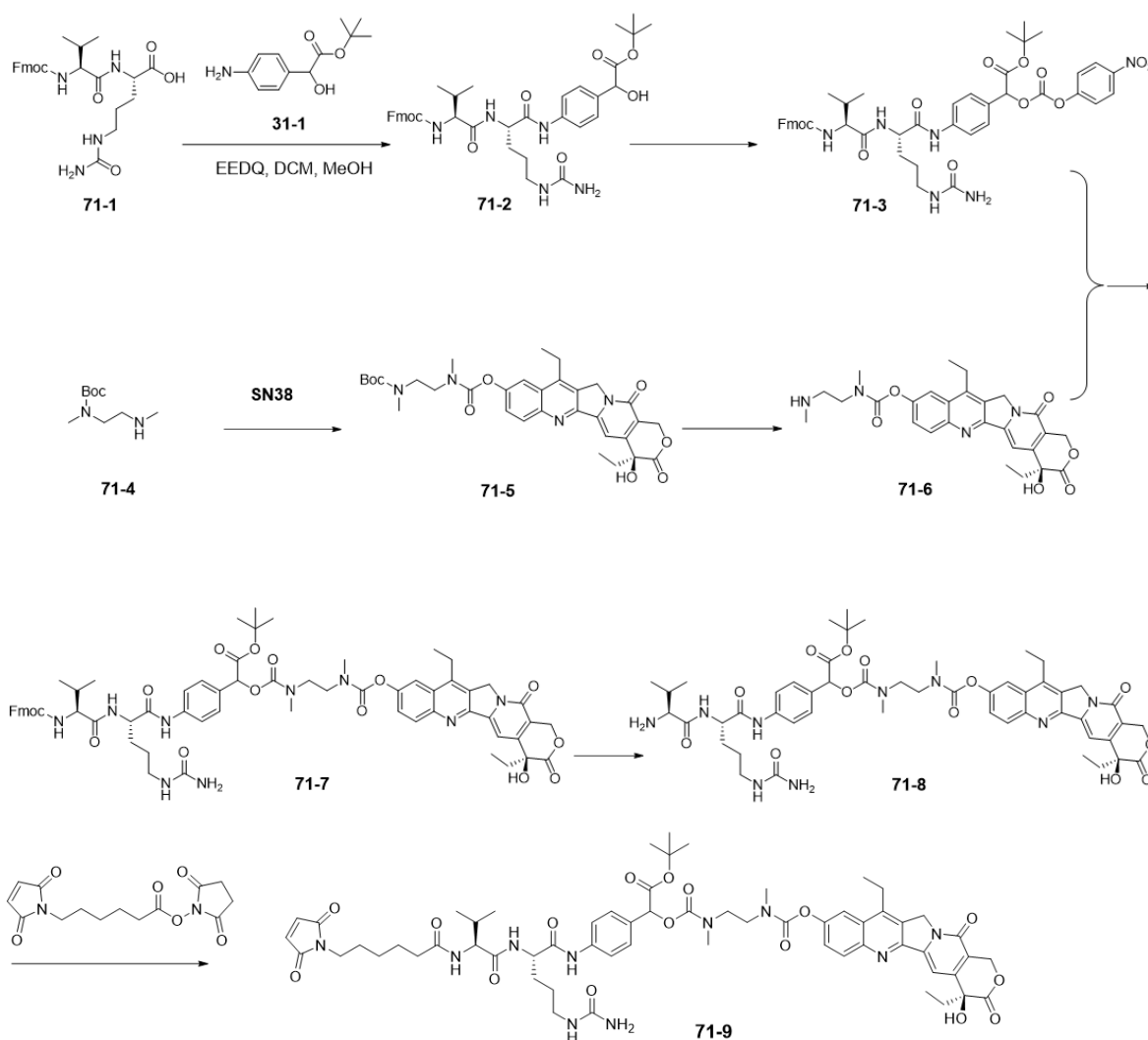
Fosfato de amonio cuaternario (8.93 mg, 0.046 mmol, Cas#: 853798-56-8, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método sintético, que hace referencia a WO2005114193) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (0.008 mL, 0.046 mmol) y HATU (12.94 mg, 0.034 mmol) para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, entonces agregar compuesto 65-13 (37 mg, 0.031 mmol) para agitar durante 2 horas. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. La preparación de fase inversa (ácido fórmico) se realizó para obtener 11.5 mg de sólido blanco.

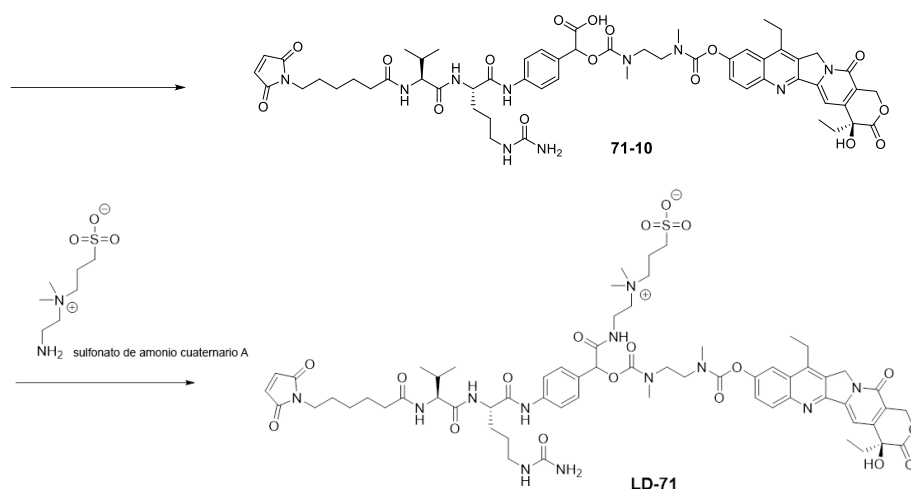
LCMS: m/z (ES+) (M+H)⁺ = 1420.6, R_t = 1.246 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.11 (s, 1H), 8.23-8.17 (m, 1H), 8.07 – 7.87 (m, 2H), 7.79 – 7.69 (m, 2H), 7.45 – 7.13 (m, 4H), 7.00 (s, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.47 – 5.06 (m, 8H), 4.83 (dd, J = 45.6, 17.8 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.21 – 4.09 (m, 4H), 3.49-3.48 (m, 16H), 3.19 – 3.10 (m, 12H), 2.96 (s, 5H), 2.39 – 2.32 (m, 8H), 1.99 – 1.83 (m, 4H), 1.30 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.90-0.82 (m, 9H).

Ejemplo 9 (Preparación de LD-71)

El esquema sintético de LD-71 es como a continuación:





Síntesis de 71-2

El Compuesto 31-1 (240 mg, 1.075 mmol) y el compuesto 71-1 (267 mg, 0.538 mmol, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd. para el método de síntesis, que hace referencia a WO2022058548A1) se disolvieron en 3 mL de DCM anhidro y 1.5 mL de metanol, agregar EEDQ (266 mg, 1.075 mmol) para agitar durante 3 horas a temperatura ambiente. Se precipitó un producto sólido. La detección de LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de filtrar la solución de reacción, se lavó la torta de filtración con DCM tres veces, se secó bajo presión reducida para obtener 260 mg de un producto final. MS(+)=702.4.

Síntesis de 71-3

El compuesto 71-2 (240 mg, 0.342 mmol), carbonato de bis(p-nitrofenilo) (312.09 mg, 1.026 mmol) y DIEA (0.170 mL, 1.026 mmol) se disolvieron en 5 mL de DMF anhidro para agitar durante 16 horas a temperatura ambiente. La detección de LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 5% a 10%) para obtener 220 mg de un producto final. MS(+)=867.4.

Síntesis de 71-5

Trifosgeno (136.1 mg, 0.459 mmol) se disolvió en 4 mL de DCM anhidro bajo protección de nitrógeno a temperatura ambiente, agregando trietilamina (0.128 mL, 0.917 mol) y 71-4 (172.6 mg, 0.917 mol) gota a gota bajo baño de hielo para agitar durante 3 horas para reaccionar a temperatura ambiente, entonces agregar piridina (2 mL), SN38 (120 mg, 0.306 mmol) y DMAP (7.47 mg, 0.061 mol) para reaccionar durante 16 horas a 50°C. La detección de LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de la concentración y centrifugación, batir con metilo terc-butil

éter, se obtuvieron 127 mg de un producto final. MS(+)=607.4.

Síntesis de 71-6

El compuesto 71-5 (140 mg, 0.231 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM anhidro, agregando 0.6 mL de TFA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la
5 reacción se realizó completamente. Después de concentración bajo presión reducida, se obtuvieron 116.9 mg de un producto final. MS(+)=507.2.

Síntesis de 71-7

El compuesto 71-6 (116.9 mg, 0.231 mmol) y compuesto 71-3 (200 mg, 0.231 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMSO y 1 mL de DMF, agregando HOBt (31.17 mg, 0.231 mmol) y DIEA
10 (59.64 mg, 0.461 mmol) sucesivamente, calentándose a 40°C para agitar durante 3 horas, entonces agregar solución salina saturada en la solución de reacción para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 200 mg de un producto final. MS(+)=1234.6.

Síntesis de 71-8

100 mg de producto crudo compuesto 71-7 se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando piridina (0.05 mL) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de
15 concentración bajo presión reducida, batir con metilo terc-butil éter y filtrar, se obtuvieron 100 mg de un producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS (+)=1012.6.

Síntesis de 71-9

100 mg de producto crudo compuesto 71-8 y éster de N-hidroxisuccinimida de ácido
20 6-maleimidohexanoico (43.9 mg, 0.142 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de agregar agua en la solución de reacción y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para
25 obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar placa de sílica de capa delgada (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 60 mg de un producto final. MS(+)=1205.6.

Síntesis de 71-10

El compuesto 71-9 (60 mg, 0.05 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM, agregando 0.3 mL TFA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó
30 completamente. Después de concentración bajo presión reducida, se obtuvieron 57 mg de un producto final. MS(+)=1149.6.

Síntesis de LD-71

El compuesto 71-10 (57 mg, 0.05 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro, agregando HATU (20.76 mg, 0.055 mmol) para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente,
35 entonces agregar sulfato de amonio cuaternario A (15.64 mg, 0.074 mmol, CAS#: 78276-19-4,

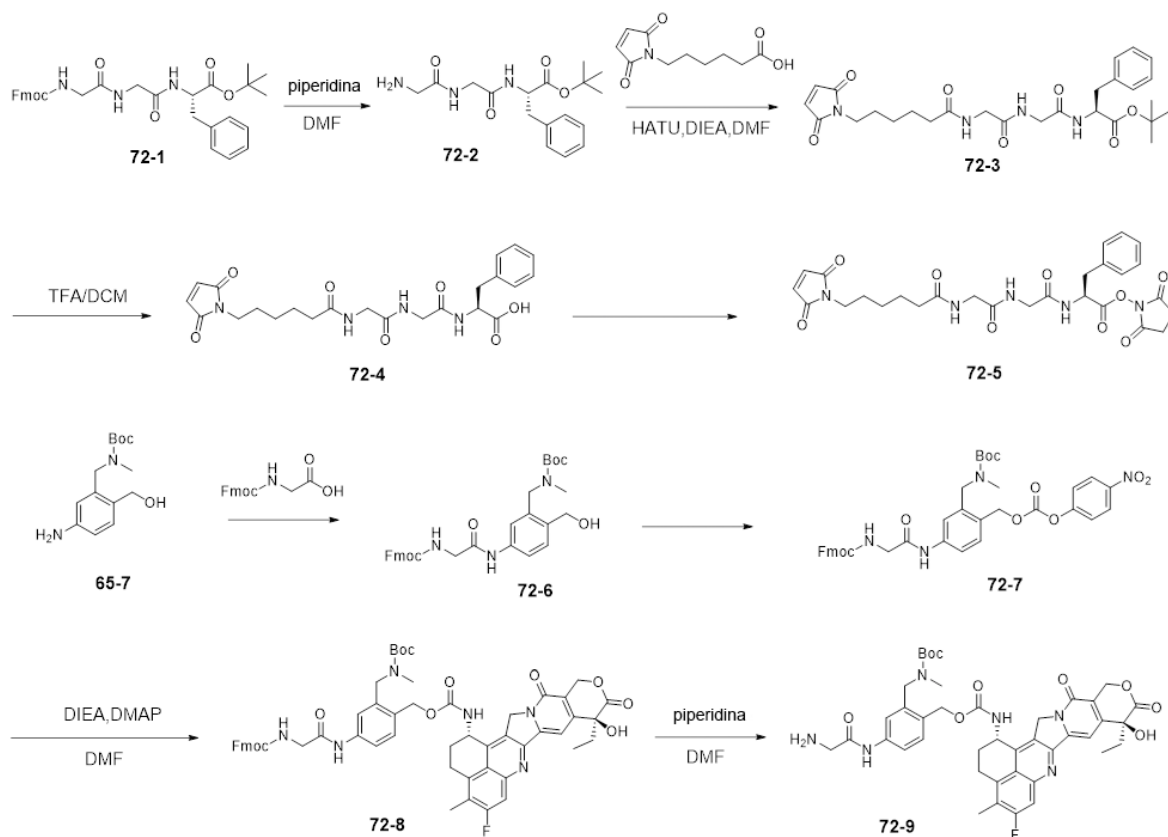
proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método de síntesis, que hace referencia a WO2011146595A2) y DIEA (0.025 mL, 0.149 mmol) sucesivamente para agitar continuamente durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Se realizó preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 0.1% de ácido fórmico) para obtener 24.0 mg de sólido blanco.

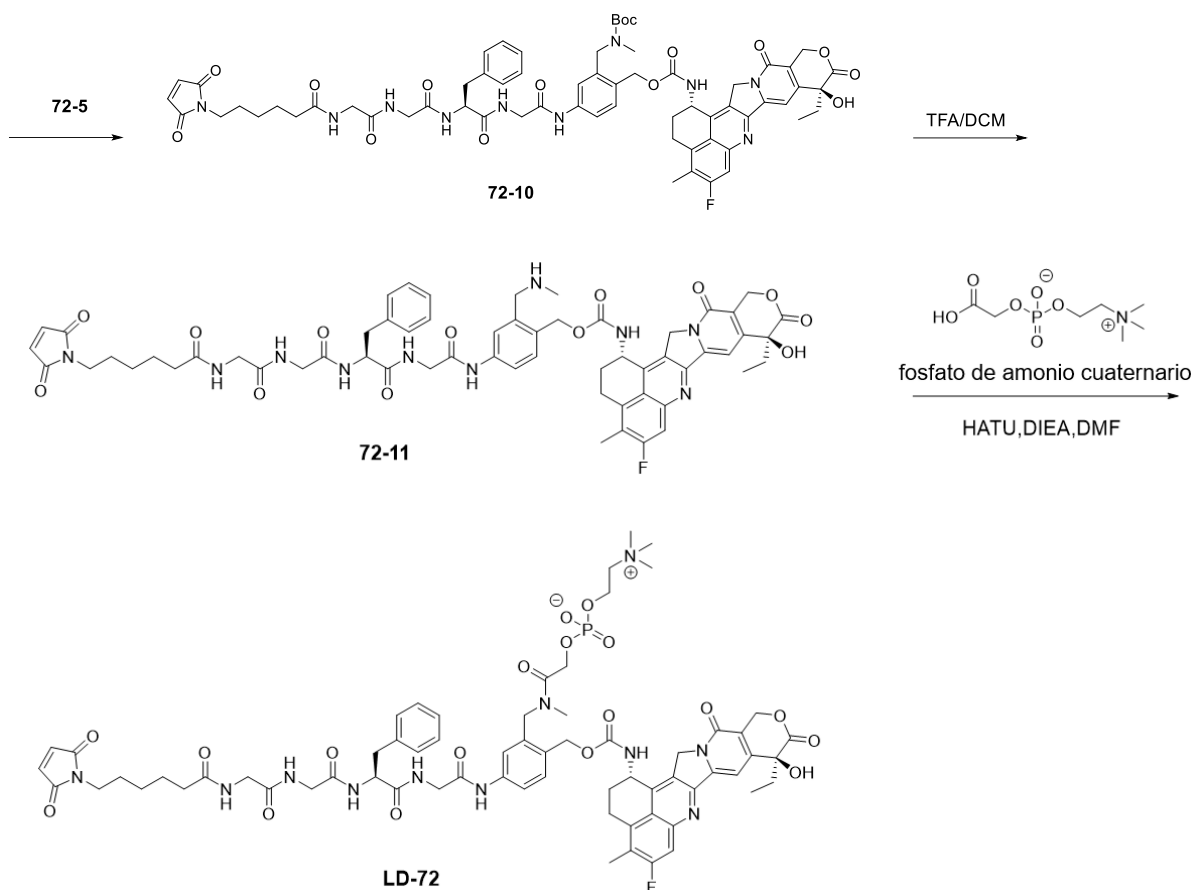
LCMS: $m/z(E^+)(M+H)^+=1341.6$, $R_t=1.210$ min

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.04-9.96 (m, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.185-8.085 (m, 2H), 7.968-7.782 (m, 3H), 7.63 – 7.32 (m, 9H), 6.99 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.70 (d, $J = 20.6$ Hz, 1H), 5.43-5.41 (m, 5H), 5.35 (s, 3H), 4.35-4.25 (m, 1H), 4.19-4.17 (m, 1H), 3.07-2.91 (m, 20H), 1.97 – 1.83 (m, 8H), 1.52 – 1.42 (m, 6H), 1.32 – 1.15 (m, 9H), 0.90-0.82 (m, 9H).

Ejemplo 10 (Preparación de LD-72)

El esquema sintético de LD-72 es como a continuación:





Síntesis de 72-2

El Compuesto 72-1 (600 mg, 1.076 mmol) se disolvió en 4 mL de DMF anhidro, agregando 0.1 mL de piperidina para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de destilación bajo presión reducida y batiendo con éter de petróleo, se obtuvieron 350 mg de producto crudo. MS+Na(+)=357.9.

Síntesis de 72-3

El Compuesto 72-2 (360 mg, 1.073 mmol) y ácido 6-maleimido-hexanoico (340 mg, 1.610 mmol) se disolvieron en 10 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (0.532 mL, 3.219 mmol) y HATU (817 mg, 2.150 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 400 mg de producto final. MS(+)=529.6.

Síntesis de 72-4

El Compuesto 72-3 (90 mg, 0.071 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM anhidro,

agregando TFA (0.8 mL) en la solución de reacción para agitar durante 18 horas a temperatura ambiente. Se obtuvieron 80 mg de producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)=473.5.

Síntesis de 72-5

- 5 El Compuesto 72-4 (150 mg, 0.317 mmol) se disolvió en 2 mL de DCM anhidro, agregando HOSu (40.2 mg, 0.349 mmol) y EDCI (67.2 mg, 0.351 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de destilación bajo presión reducida, se obtuvieron 160 mg de producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)=569.8.

Síntesis de 72-6

- 10 El compuesto 65-7 (700 mg, 2.628 mmol) y Fmoc-glicina (1.56 g, 5.25 mmol) se disolvieron en 20 mL de THF anhidro, agregando EEDQ (780 mg, 3.158 mmol) para agitar durante 18 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para
15 obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 5%) para obtener 1000 mg de producto final. MS+Na(+)=567.8.

Síntesis de 72-7

- El Compuesto 72-6 (290 mg, 0.531 mmol) se disolvió en 6 mL de THF anhidro, agregando cloroformato de p-nitrofenilo (129 mg, 0.640 mmol) y piridina (63 mg, 0.797 mmol)
20 sucesivamente para reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de agregar agua en la solución de reacción y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 5%) para obtener 300 mg de un producto final. MS+Na(+)=732.7.

Síntesis de 72-8

- 25 El Compuesto 72-7 (340 mg, 0.478 mmol) y mesilato de exatecan (254 mg, 0.478 mmol) se disolvieron en 8 mL de DMF anhidro, agregando DMAP (8 mg, 0.025 mmol) y DIEA (0.237 mL, 1.434 mmol) sucesivamente para reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de agregar agua en la solución de reacción y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron
30 las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 380 mg de producto final. MS(+)=1006.7.

Síntesis de 72-9

- 35 El Compuesto 72-8 (300 mg, 0.298 mmol) se disolvió en 3 mL de DMF anhidro, agregando 0.06 mL de piperidina para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de

destilación bajo presión reducida y batiendo con éter de petróleo, se obtuvieron 230 mg de producto crudo. MS(+)=785.8.

Síntesis de 72-10

El Compuesto 72-9 (180 mg, 0.316 mmol) y compuesto 72-5 (207 mg, 0.264 mmol) se disolvieron en 3 mL de DMF anhidro, agregando DIEA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de agregar agua en la solución de reacción y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, luego filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar placa de silicona de capa delgada (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 100 mg de producto final. MS(+)=1240.8.

Síntesis de 72-11

El compuesto 71-10 (90 mg, 0.071 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM anhidro, agregando TFA (0.3 mL) en la solución de reacción para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se obtuvieron 36 mg de producto crudo y se usaron directamente para la siguiente reacción. MS(+)=1138.6.

Síntesis de LD-72

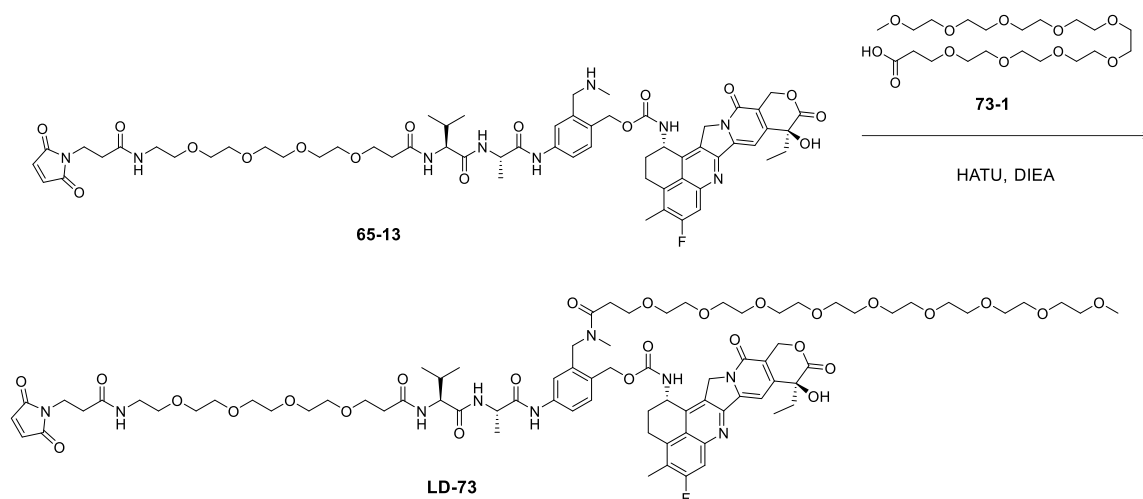
El compuesto 71-11 (36 mg, producto crudo) y fosfato de amonio cuaternario (11.4 mg, 0.047 mmol, Cas#: 853798-56-8, proporcionado por Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método de síntesis, que hace referencia a WO2005114193) se disolvieron en 3 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (0.015 mL, 0.093 mmol) y HATU (24 mg, 0.032 mmol) para agitar durante 3 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Se realizó preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 10 mM NH₄OAc) para obtener 15 mg de producto sólido blanco.

LCMS:m/z(ES+)(M+H)+=1361.5, Rt=1.114 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.01 (d, J = 12 Hz, 1H), 9.04 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.40 (s, 2H), 8.27 – 8.07 (m, 3H), 7.79 – 7.60 (m, 2H), 7.48 – 7.11 (m, 9H), 6.99 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.57 – 5.00 (m, 8H), 4.94 – 4.37 (m, 5H), 4.25 – 4.09 (m, 2H), 3.99 – 3.48 (m, 10H), 3.08 (d, J = 13.6 Hz, 7H), 2.94 (d, J = 13.2 Hz, 9H), 2.40 – 2.33 (m, 3H), 2.19 – 2.07 (m, 4H), 1.91 – 1.81 (m, 2H), 1.52 – 1.41 (m, 4H), 1.33 – 1.00 (m, 3H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

Ejemplo 11 (Preparación de LD-73)

El esquema sintético de LD-73 es como a continuación:



Síntesis de LD-73

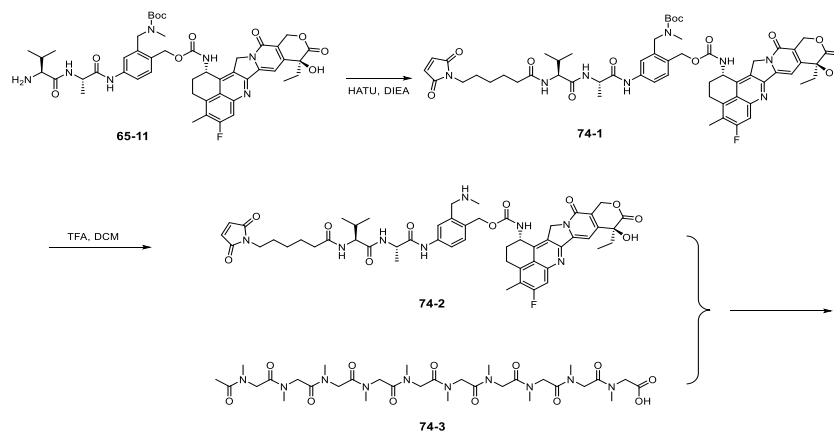
El Compuesto 73-1 (25.19 mg, 0.055 mmol) y HATU (20.98 mg, 0.055 mmol) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, entonces agregar compuesto 65-13 (60 mg, 0.050 mmol) y DIEA (0.008 mL, 0.075 mmol) sucesivamente para reaccionar durante 2 horas. La detección de LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. La preparación de fase inversa se realizó directamente (fase móvil, que contiene 0.1% de ácido fórmico) en el sistema de reacción para obtener 19 mg de producto sólido blanco.

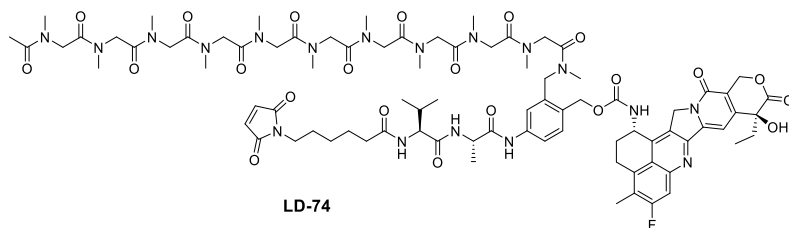
LCMS: m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 1634.8, R_t = 1.392 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.96 (d, J = 40.0 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.78 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 4H), 6.99 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 3H), 5.29 (s, 5H), 5.13-5.10 (m, 3H), 4.67 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.36 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.22-4.19 (m, 1H), 3.66 – 3.55 (m, 10H), 3.52-3.40 (m, 50H), 3.23 (s, 6H), 3.18-3.10 (m, 5H), 1.24 (s, 3H), 0.89-0.81 (m, 9H).

Ejemplo 12 (Preparación de LD-74)

El esquema sintético de LD-74 es como a continuación:





Síntesis de 74-1

Ácido 6-maleimidoheptanoico (18.59 mg, 0.088 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF anhidro, agregando HATU ((33.46 mg, 0.088 mmol) para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, agregar compuesto 65-11 (72.11 mg, 0.080 mmol) y DIEA (0.020 mL) sucesivamente para agitar continuamente durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de agregar agua y extraer con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas, lavar con solución salina saturada, secar sobre sulfato de sodio anhidro, entonces filtrar y concentrar para obtener un producto crudo. Se realizó purificación al usar columna de gel de sílice de fase normal (MeOH/DCM, 0% a 10%) para obtener 80 mg de producto final. MS (+)1091.6.

Síntesis de 74-2

El compuesto 74-1 (65 mg, 0.073 mmol) se disolvió en 3 mL de DCM anhidro, agregando 0.6 mL de TFA para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Después de concentración bajo presión reducida, se obtuvieron 65 mg de producto final. MS (+)=991.4.

Síntesis de LD-74

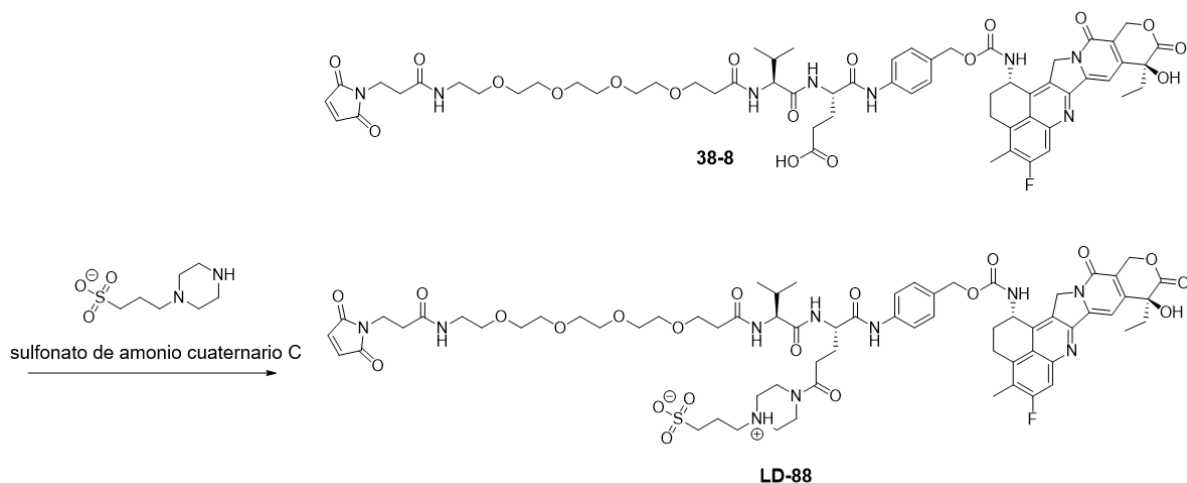
El compuesto 74-3 (20.00 mg, 0.026 mmol, comprado de Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd., para el método de síntesis, que hace referencia a WO2022228493) se disolvió en 1 mL de DMF anhidro, agregando HATU (10.85 mg, 0.029 mmol) para agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, agregar compuesto 74-2 (25.71 mg, 0.026 mmol) y DIEA (0.008 mL, 0.046 mmol) sucesivamente para agitar continuamente durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. Se realizó preparación de fase inversa (fase móvil, que contiene 10 mM NH₄OAc) en la solución de reacción para obtener 9.5 mg de sólido blanco.

LCMS: m/z (ES+) (M+H)⁺ = 1743.9, Rt = 1.325 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.79 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.28 (s, 3H), 5.12 (s, 2H), 4.33-4.04 (m, 26H), 2.98 – 2.66 (m, 45H), 1.90 (m, 7H), 1.49-1.47 (m, 5H), 1.31 – 1.15 (m, 7H), 0.89-0.81 (m, 9H).

Ejemplo 13 (Preparación de LD-88)

El esquema sintético de LD-88 es como a continuación:

**Síntesis de LD-88**

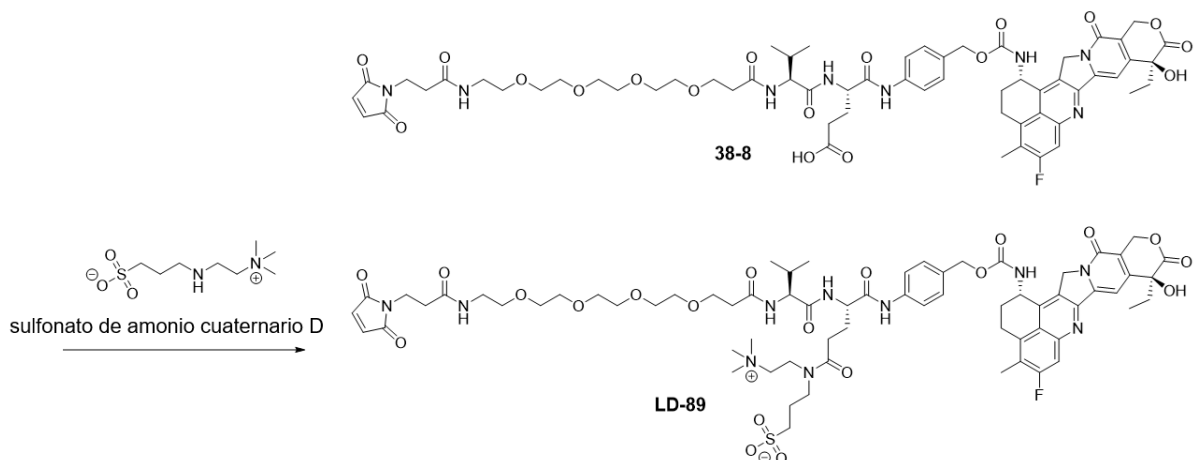
- 5 El Compuesto 38-8 (50 mg, 0.041 mmol, el método sintético referido para el Ejemplo 3) y sulfato de amonio cuaternario C (16.34 mg, 0.078 mmol, CN115521998, Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd.) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (0.010 mL, 0.062 mmol) y HATU(17.27 mg, 0.045 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS
- 10 mostró que la reacción se realizó completamente. La preparación de fase inversa se realizó directamente (ácido trifluoroacético) en la solución de reacción para obtener LD-88 como sólido amarillo claro (10.0 mg, 17.28% de rendimiento).

LCMS: m/z (ES+) (M+H)⁺ = 1402.6, R_t = 1.303 min

- 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.06 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.19 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.10-8.00 (m, 2H), 7.91 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.29 (s, 3H), 5.09 (s, 2H), 4.45-4.41 (m, 2H), 4.20-3.99 (m, 2H), 3.62-3.57 (m, 4H), 3.51-3.47 (m, 14H), 3.19-3.13 (m, 5H), 2.67 (dt, J = 9.2, 4.4 Hz, 4H), 2.39 (s, 5H), 2.36-2.31 (m, 5H), 2.19 (s, 3H), 2.06-1.82 (m, 10H), 0.90-0.84 (m, 9H).

Ejemplo 14 (Preparación de LD-89)

El esquema sintético de LD-89 es como a continuación:



5 Síntesis de LD-89

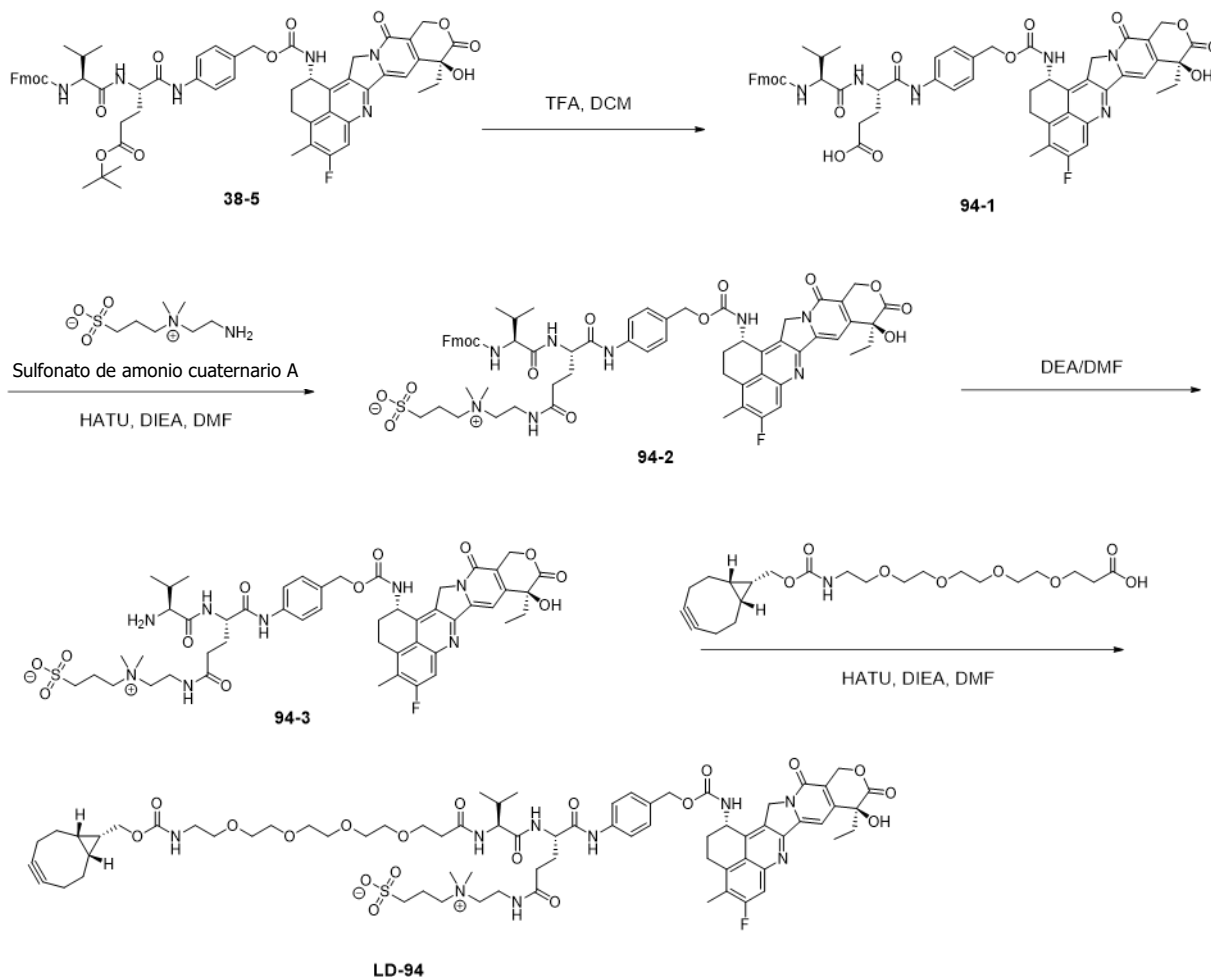
El Compuesto 38-8 (50 mg, 0.041 mmol, el método sintético referido para el Ejemplo 3) y sulfato de amonio cuaternario D (17.58 mg, 0.078 mmol, Bioconjugate Chem. 2022, 33,718–725, Shanghai Haoyuan Pharmaceutical Co., Ltd.) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro, agregando DIEA (0.010 mL, 0.062 mmol) y HATU (17.27 mg, 0.045 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. LCMS mostró que la reacción se realizó completamente. La preparación de fase inversa (ácido fórmico) se realizó directamente en la solución de reacción para obtener 11.5 mg de LD-89 como sólido blanco (5.4 mg, 10.06% de rendimiento).

LCMS: m/z (ES+) (M+H)⁺ = 1418.6, R_t = 1.288 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.86 (s, 1H), 8.11 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.01 – 7.89 (m, 3H), 7.71 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.45 (s, 1H), 5.38 (s, 2H), 5.22 (d, J = 4.0 Hz, 3H), 5.01 (s, 2H), 4.35 – 4.30 (m, 1H), 4.15–4.12 (m, 1H), 3.52 (s, 8H), 3.42 (d, J = 3.6 Hz, 17H), 3.25 (s, 5H), 3.09 – 2.99 (m, 14H), 2.31 (s, 4H), 2.26 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 2.16–2.07 (m, 2H), 1.88–1.82 (m, 8H), 0.82–0.76 (m, 9H).

Ejemplo 15 (Preparación de LD-94)

El esquema sintético de LD-94 es como a continuación:



Síntesis del Compuesto 94-1

5 El compuesto 38-5 (450 mg, 0.412 mmol; el método sintético se refiere al Ejemplo 3) se añadió en diclorometano (5 mL), se agregó ácido trifluoroacético (1 mL) gota a gota al sistema de mezcla, agitándose durante 2 horas a temperatura ambiente. El sistema de mezcla se concentró hasta sequedad para obtener un producto crudo, el cual se utilizó para el siguiente paso. m/z (ES+) (M+1) = 1035.4.

10 Síntesis del compuesto 94-2

El compuesto 94-1 (400 mg, 0.386 mmol), el sulfonato de amonio cuaternario A (121.90 mg, 0.580 mmol) y DIEA (74.91 mg, 0.580 mmol) se disolvieron en DMF (4 mL) y se agitó el sistema de mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente; incorporando HATU (161.63 mg, 0.425 mmol) al sistema de reacción durante 4 horas a temperatura ambiente. La purificación se realizó mediante columna en fase reversa (agua: acetonitrilo, 0% a 70%) para obtener 170 mg del producto final. m/z (ES+) (M+1) = 1227.6.

Síntesis del compuesto 94-3

El compuesto 94-2 (70 mg, 0.057 mmol) se disolvió en DMF (1 mL) y se añadió dietilamina (14.30 mg, 0.196 mmol) gota a gota al sistema de mezcla, agitándose durante 2 horas a temperatura ambiente. El sistema de mezcla se concentró hasta sequedad, se trató con éter de petróleo y se filtró; luego, la torta de filtro se secó y se utilizó directamente en el siguiente paso. m/z (ES+) (M+1) = 1005.6.

Síntesis de LD-94

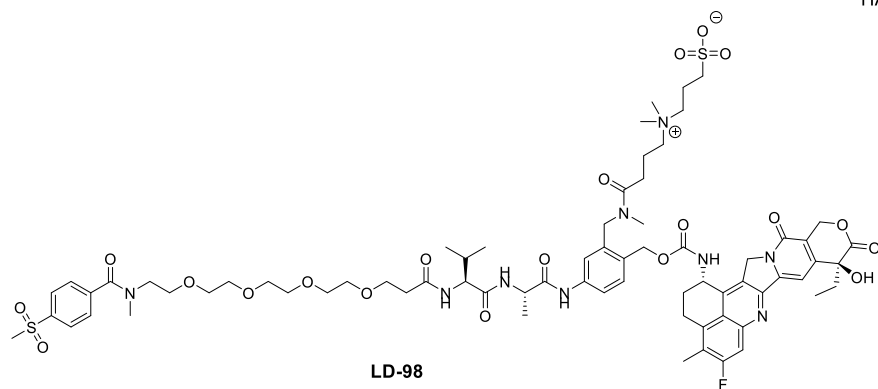
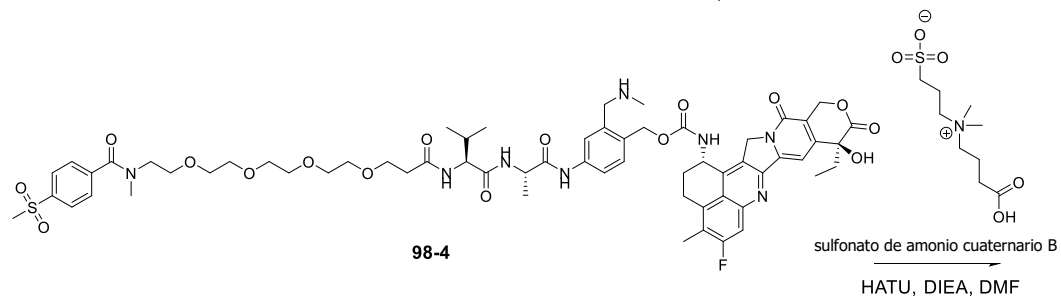
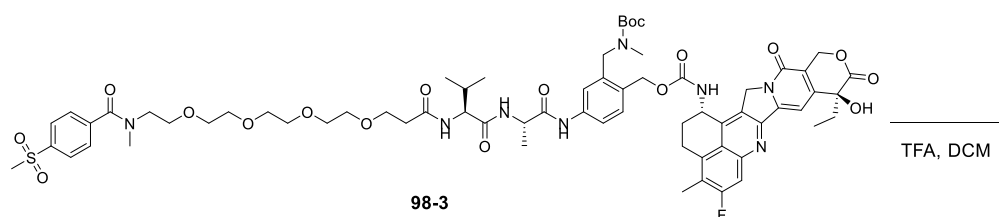
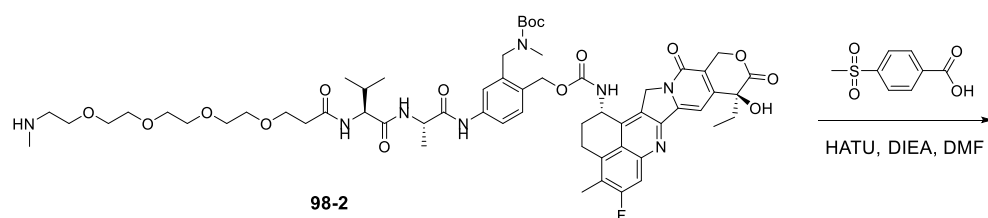
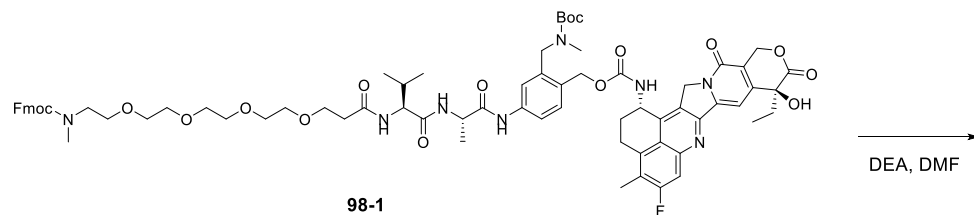
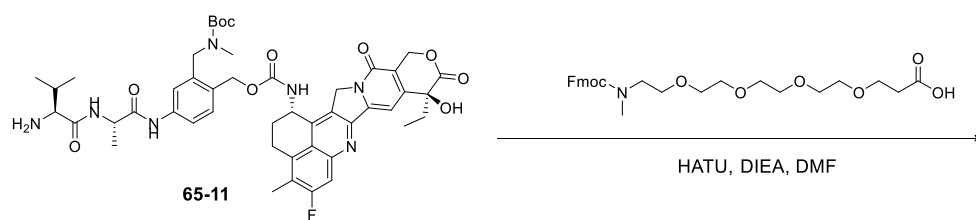
El compuesto 94 (55 mg, 0.055 mmol), BCN-PEG4-ácido (CAS# 1881221-47-1, 24.16 mg, 0.055 mmol) y DIEA (0.011 mL, 0.067 mmol) se disolvieron en DMF (2 mL) y se agitaron durante 5 minutos a temperatura ambiente; a continuación, se añadió HATU (18.73 mg, 0.049 mmol) y se continuó la agitación del sistema de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto LD-94 (6 mg, rendimiento: 7.68%) se obtuvo mediante HPLC preparativo (sistema NH_4HCO_3).

LCMS: m/z (ES+) (M+H)+ = 1427.6, R_t = 1.721 min.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.90 (s, 1H), 8.19 (s, 2H), 8.09 – 8.05 (m, 1H), 8.00 – 7.96 (m, 1H), 7.79 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.29 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.19 – 4.15 (m, 1H), 4.02 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 3.62 – 3.58 (m, 2H), 3.50 – 3.47 (m, 16H), 3.10 (s, 2H), 3.04 – 3.02 (m, 7H), 2.69 – 2.66 (m, 4H), 2.40 – 2.36 (m, 5H), 2.34 – 2.32 (m, 4H), 2.22 – 2.15 (m, 9H), 1.99 (s, 4H), 1.92 – 1.86 (m, 3H), 1.55 – 1.46 (m, 2H), 1.23 (s, 2H), 0.90 – 0.83 (m, 14H).

Ejemplo 16 (Preparación de LD-98)

El esquema sintético de LD-98 es como sigue:



Síntesis del Compuesto 98-1

El compuesto 65-11 (120 mg, 0.134 mmol; el método de síntesis se refiere al Ejemplo 5) y Fmoc-NMe-PEG4-C2-ácido (CAS# 2170240-98-7, 67.0 mg, 0.134 mmol) se disolvieron en DMF (2 mL), añadiendo sucesivamente HATU (55.9 mg, 0.147 mmol, 1.1 eq) y N,N-diisopropiletilamina (26 mg, 0.200 mmol, 1.5 eq) sucesivamente para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:MeOH, 0–10% de MeOH) para obtener 100 mg del producto final. m/z (ES+) (M+1) = 1381.6.

Síntesis del compuesto 98-2

El compuesto 98-1 (100 mg, 0.072 mmol) se disolvió en DMF (2 mL) añadiendo dietilamina (15.88 mg, 0.217 mmol) para agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida para obtener 100 mg de un producto crudo. m/z (ES+) (M+1) = 1159.6.

Síntesis del compuesto 98-3

El compuesto 98-2 (80 mg, 0.069 mmol) y ácido 4-metilsulfonilbenzoico (13.95 mg, 0.069 mmol) se disolvieron en DMF (2 mL), añadiendo sucesivamente HATU (28.86 mg, 0.076 mmol) y DIPEA (13.38 mg, 0.104 mmol), y el sistema de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de fase reversa (C18, solución acetonitrilo-H₂O al 20–60%) para obtener 26 mg de un sólido amarillo. m/z (ES+) (M+1) = 1343.49.

Síntesis del compuesto 98-4

El compuesto 98-3 (25 mg, 0.019 mmol) se disolvió en DCM (2 mL) y se añadió TFA (0.4 mL) para agitar la solución de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida para obtener un producto crudo, el Compuesto 18 (23 mg), que se utilizó directamente en la siguiente reacción. m/z (ES+) (M+1) = 1243.4.

Síntesis de LD-98

El compuesto 98-4 (23 mg, 0.018 mmol) y el sulfonato de amonio cuaternario B (7.03 mg, 0.028 mmol) se disolvieron en DMF (1 mL), añadiendo sucesivamente HATU (7.74 mg, 0.020 mmol) y DIPEA (3.59 mg, 0.028 mmol), para agitar la solución de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. A partir de este sistema de reacción se obtuvo LD-98 (6 mg, rendimiento: 22.2%) mediante HPLC preparativo (TFA).

LCMS: m/z (ES+) (M+H)+ = 1479.6, R_t = 1.340 min.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.97 (d, J = 40.2 Hz, 1H), 9.14 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 8.19 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.78 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 49.2, 8.4 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 5.30 (s, 3H),

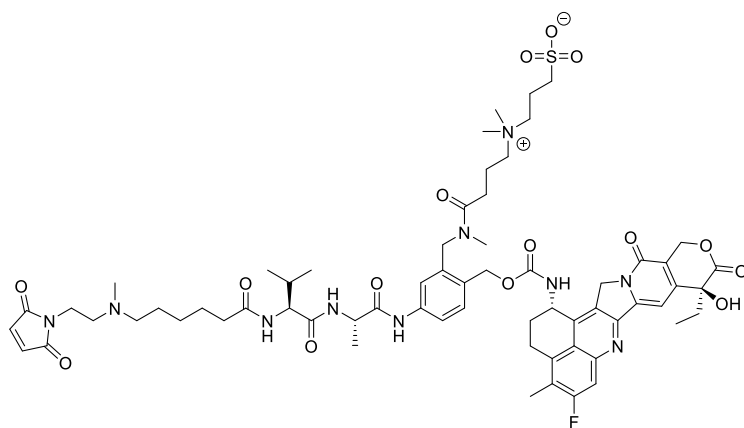
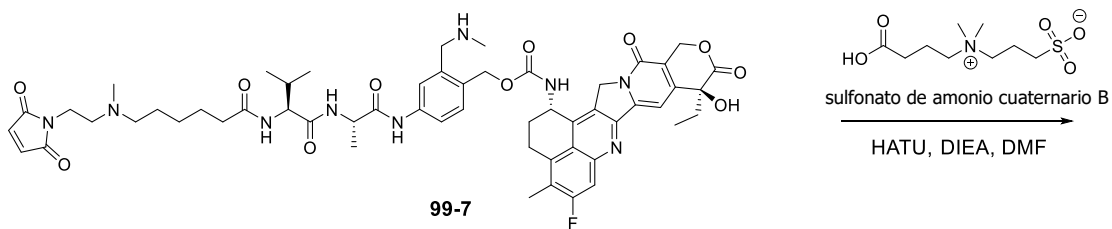
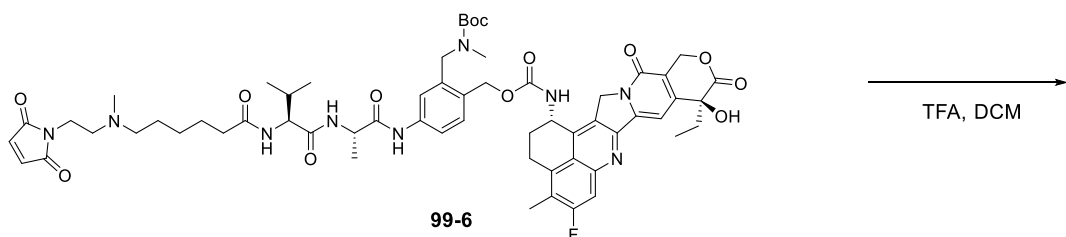
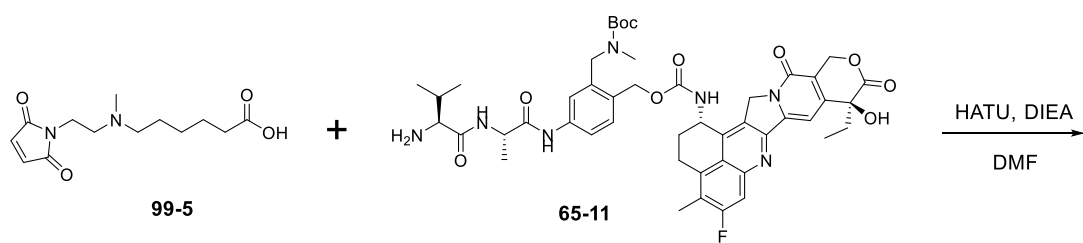
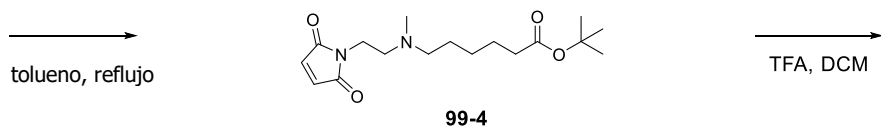
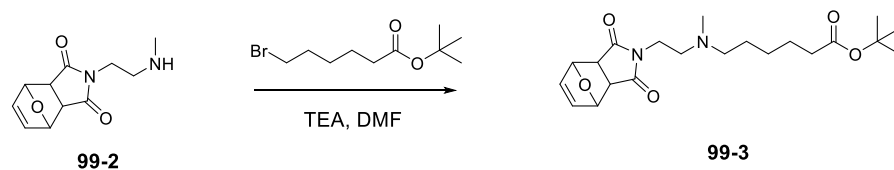
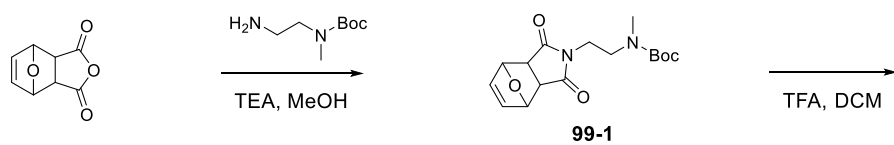
5.12 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 4.64 (d, $J = 26.4$ Hz, 2H), 4.36 (dd, $J = 13.6, 6.8$ Hz, 1H), 4.23 – 4.14 (m, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.59 – 3.54 (m, 3H), 3.51 – 3.46 (m, 15H), 3.43 (s, 4H), 3.03 (d, $J = 9.2$ Hz, 7H), 2.98 (s, 3H), 2.92 (s, 2H), 2.86 (s, 1H), 2.68 – 2.67 (m, 1H), 2.38 (s, 5H), 2.33 (dd, $J = 3.6, 1.8$ Hz, 2H), 2.20 (s, 2H), 1.98 – 1.83 (m, 8H), 1.31 – 1.23 (m, 4H), 0.89 – 0.81 (m, 10H).

5

Ejemplo 17 (Preparación de LD-99)

El esquema sintético de LD-99 es como a continuación:

113



LD-99

Síntesis del Compuesto 99-1

El anhídrido exo-3,6-epoxi-1,2,3,6-tetrahidroftálico (CAS# 6118-51-0, 2 g, 12.04 mmol, 1.0 eq) y N-Boc-N-metiletilendiamina (CAS# 121492-06-6, 2.52 g, 14.46 mmol, 1.2 eq) se disolvieron en metanol (60 mL), añadiéndose trietilamina (2.43 g, 24.1 mmol, 2.0 eq) a temperatura ambiente; luego, la solución de reacción se calentó hasta 65 °C y se dejó reaccionar durante 48 horas. Después de la concentración de la solución de reacción, se diluyó con acetato de etilo (60 mL), se lavó con solución salina saturada y se secó con sulfato de sodio anhidro, seguido de filtración y concentración. Mediante purificación por cromatografía en columna (éter de petróleo: acetato de etilo = 1:1) se obtuvieron 3 g de un sólido blanco. m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 323.3.

10 Síntesis del Compuesto 99-2

El compuesto 99-1 (2.3 g, 7.135 mmol) se disolvió en diclorometano (20 mL), añadiendo ácido trifluoroacético (4 mL) bajo baño de hielo, y se llevó la solución de reacción a temperatura ambiente para reaccionar durante 1 hora. Después de la concentración de la solución de reacción, se obtuvieron 1.5 g de producto crudo. m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 223.2.

15 Síntesis del Compuesto 99-3

El compuesto 99-2 (1.58 g, 7.11 mmol, 1.0 eq) y 6-bromohexanoato de tert-butilo (2.14 g, 8.52 mmol, 1.2 eq) se disolvieron en DMF (10 mL) y se dejaron reaccionar durante 72 horas a temperatura ambiente. Después de la concentración de la solución de reacción, se obtuvieron 2.5 g del producto objetivo mediante purificación por cromatografía en columna (éter de petróleo: acetato de etilo = 3:1). m/z (ES⁺) (M+Na)⁺ = 393.2.

Síntesis del Compuesto 99-4

El compuesto 99-3 (1.5 g, 3.822 mmol) se disolvió en tolueno (15 mL) y se calentó hasta 110 °C para reaccionar durante 18 horas. Después de la concentración de la solución de reacción, se obtuvo 1 g del producto objetivo como una sustancia aceitosa amarilla. m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 325.2.

25 Síntesis del Compuesto 99-5

El compuesto 99-4 (100 mg, 0.308 mmol) se disolvió en diclorometano (2 mL), añadiendo ácido trifluoroacético (0.7 mL) para agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la concentración de la solución de reacción, se obtuvieron 82 mg de producto crudo como una sustancia aceitosa amarilla. m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 269.2.

30 Síntesis del Compuesto 99-6

El compuesto 65-11 (88 mg, 0.098 mmol, 1.0 eq) y el compuesto 99-5 (78.8 mg, 0.294 mmol, 3.0 eq) se disolvieron en DMF (3 mL), añadiendo sucesivamente HATU (112 mg, 0.294 mmol, 3.0 eq) y diisopropiletilamina (0.081 mL, 0.489 mmol, 5.0 eq) sucesivamente para reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la filtración de la solución de reacción, se obtuvieron 80 mg de un sólido amarillo mediante purificación por cromatografía en columna inversa.

m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 1147.7.

Síntesis del Compuesto 99-7

El compuesto 99-6 (80 mg, 0.070 mmol) se disolvió en diclorometano (3 mL), añadiéndose ácido trifluoroacético (0.3 mL) gota a gota, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la concentración de la solución de reacción, se obtuvieron 73 mg de producto crudo en forma de una sustancia aceitosa amarilla.

m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 1047.6.

Síntesis de LD-99

El compuesto 99-7 (73 mg, 0.070 mmol, equivalente molar 1.0) y el sulfonato de amonio cuaternario B (35 mg, 0.14 mmol, equivalente molar 2.0) se disolvieron en DMF (2 mL), añadiendo de manera sucesiva HATU (53 mg, 0.14 mmol, equivalente molar 2.0) y N,N-diisopropiletilamina (0.058 mL, 0.35 mmol, equivalente molar 5.0), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la filtración de la mezcla de reacción, se obtuvieron 9.2 mg de un sólido blanco mediante purificación.

LCMS: m/z (ES⁺)(M+H)⁺=1284.6, Rt=1.217 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.01 (d, J = 38.5 Hz, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.26 – 8.16 (m, 1H), 8.13 – 8.01 (m, 1H), 7.80 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 47.3, 8.1 Hz, 1H), 7.41 – 7.31 (m, 3H), 7.17 (s, 1H), 7.10 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 5.29 (s, 3H), 5.13 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.64 (d, J = 27.5 Hz, 2H), 4.36 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.22 – 4.16 (m, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.22 (s, 2H), 3.05 (s, 5H), 2.99 (d, J = 3.8 Hz, 4H), 2.94 (s, 2H), 2.87 (s, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.36 (d, J = 18.7 Hz, 5H), 2.19 (dd, J = 13.7, 7.2 Hz, 5H), 2.06 – 1.84 (m, 9H), 1.53 (s, 5H), 1.34 – 1.21 (m, 7H), 0.89 – 0.83 (m, 9H).

Ejemplo Experimental 18 (Preparación del Compuesto de Fórmula (2))

Método de conjugación 1 (reducción completa, la relación de fármaco a anticuerpo es 8)

El anticuerpo se transfirió a un tampón fosfato de pH 7.4 al usar un tubo de centrifuga de ultrafiltración para remover el exceso de TCEP con 10 a 15 veces el número molar del anticuerpo para reaccionar a 37 °C durante 2 horas para abrir los enlaces disulfuro entre las cadenas del anticuerpo. Después de que se completó la reducción, el anticuerpo se transfirió a un tampón fosfato pH 7.4 usando un tubo de centrifuga de ultrafiltración para retirar el exceso de TCEP, incorporando el enlazador-fármaco (compuesto de Fórmula (1), Compuesto MC-GGFG-Exatecan, Compuesto MC-GGFG-Dxd, y el Compuesto ELC122 preparado en los Ejemplos 1 a 5 y 7 a 17) con 12 a 20 veces el número molar del anticuerpo respectivamente en el anticuerpo para reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después que se completó la reacción, cisteína con 2 veces el número molar

del enlazador-fármaco se agregó para apagar la reacción, y la solución de reacción se transfirió a un tampón de ácido acético de pH 5.5 al usar tubo de centrifuga de ultrafiltración, entonces se filtró la solución por filtro de esterilización de 0.22 micras para obtener la muestra de conjugado de anticuerpo-fármaco para uso posterior.

5

Método de conjugación 2 (reducción parcial, la relación de fármaco a anticuerpo es 4)

El anticuerpo se transfirió a un tampón fosfato de pH 7.4 al usar un tubo de centrifuga de ultrafiltración, agregar TCEP con 2.2 a 2.3 veces el número molar del anticuerpo para reaccionar a 37°C durante 2 horas para abrir los enlaces disulfuro entre las cadenas del anticuerpo. Después que se completó la reducción, el enlazador-fármaco (compuesto de la Fórmula (1) y compuesto MC-VC-PAB-MMAE preparado en el Ejemplo 6) con 6 a 8 veces el número molar del anticuerpo se agregó en el anticuerpo para reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después que se completó la reacción, cisteína con 2 veces el número molar del enlazador-fármaco se agregó para apagar la reacción, y la solución de reacción se transfirió a un tampón de ácido acético de pH 5.5 al usar tubo de centrifuga de ultrafiltración, entonces se filtró la solución por filtro de esterilización de 0.22 micras para obtener la muestra de conjugado de anticuerpo-fármaco para uso posterior.

10

15

Las Secuencias de los Anticuerpos Conjugados:

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo monoclonal 9D1 humanizado anti-Claudin18.2, SEQ ID NO:1 es como a continuación:

20

QIQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTDYHMNVWRQAPGKGLEWIGNIDPYYGSPTYNH
KFKGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCANYGRGNSFPYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

25

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo monoclonal 9D1 humanizado anti-Claudin18.2, SEQ ID NO:2 es como a continuación:

30

DIVMTQSPSSSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQRNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSFPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

35

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo monoclonal humanizado anti-receptor de folato humano (FRa) (anticuerpo Farletuzumab), SEQ ID NO: 3 es como sigue:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYTYAD
SVKGRFAISRDNANTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
5 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo monoclonal humanizado anti-receptor de folato humano (FRa) (anticuerpo Farletuzumab), SEQ ID NO:4 es como sigue:

10 DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKRWIYGTSLASGVPSRF
SGSGSGTDYTFITISLQPEDIAITYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN
RGEC

15 Análisis cromatográfico de los conjugados de anticuerpo-fármaco

Columna de análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es Tskgel G3000SWXL (TOSOH, 0008541); fase móvil es 0.1 M PB, pH 7.0, 0.1 M NaCl; elución isocrática, velocidad de flujo: 1 mL/min; temperatura de columna: 25°C. Longitud de onda de detección es 280 nm y 366 nm, respectivamente. Columna de análisis de cromatografía de interacción hidrofoba (HIC) es Butil-NPR 4.6×100 mm (TOSOH, 0042168); fase móvil A es 50 mM PB, pH 7.0, 1.5 M (NH₄)₂SO₄;
20 fase móvil B es 50 mM PB, pH 7.0, 20% de acetonitrilo. Gradiente de separación: que cambia de 0% de B a 100% de B en 2 a 20 min, temperatura de columna: 30°C, velocidad de flujo: 0.6 mL/min. Longitud de onda de detección es 280 nm y 366 nm, respectivamente. Se muestran los resultados en el Cuadro 1 y las Figuras 1A a Figura 6H.

25 Cuadro 1: resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en cada uno de los Ejemplos Experimentales y Ejemplos Comparativos

Ejemplos Experimentales	Compuestos de la Fórmula 1	Anticuerpos	Método de Conjugación	DAR	Fármacos conjugados	% de SEC	Tiempo de retención de HIC (min)
1	LD-12	9D1	1	8	Exatecan	98.40	15.489
2	LD-27	9D1	1	8	Exatecan	89.22	15.107
3a	LD-31-P1	9D1	1	8	Exatecan	99.07	13.290
3b	LD-31-P2	9D1	1	8	Exatecan	99.13	13.404
4	LD-37	9D1	1	8	Exatecan	97.50	14.069
5a	LD-38	9D1	1	8	Exatecan	98.02	13.574
5b	LD-38	Farletuzumab	1	8	Exatecan	96.84	13.359
5c	LD-38	IgG1-ISO	1	8	Exatecan	98.24	13.457
6	LD-57	9D1	2	4	MMAE	99.34	16.066
7	LD-65	9D1	1	8	Exatecan	99.28	13.455
8	LD-66	9D1	1	8	Exatecan	99.43	13.167
9	LD-71	9D1	1	8	SN38	99.39	12.928
10	LD-72	9D1	1	8	Exatecan	98.90	13.126

11	LD-73	9D1	1	8	Exatecan	99.53	16.002
12	LD-74	9D1	1	8	Exatecan	99.53	13.583
Ejemplo Comparativo 1	MC-GGFG-Exatecan	9D1	1	8	Exatecan	98.72	15.435
Ejemplo Comparativo 2	MC-VC-PAB-MMAE	9D1	2	4	MMAE	99.55	16.992
Ejemplo Comparativo 3	ELC122	9D1	1	8	SN38	100	16.742
Ejemplo Comparativo 4	MC-GGFG-Dxd (Deruxtecan)	9D1	1	8	Dxd	99.23	15.120

Conclusión: puede observarse a partir del Cuadro 1 y las Figs. 1A a Figura 6H, el anticuerpo monoclonal 9D1 humanizado anti-Claudin18.2 (WO2021160155) se usó como un anticuerpo de patrón para conjugar con el compuesto de enlazador-fármaco diseñado y controlar el compuesto de enlazador-fármaco para preparar un conjugado de anticuerpo-fármaco. Los compuestos de enlazador-fármaco MC-GGFG-Exatecan (Shanghai Haoyuan Biomedica, Cas#HY-114233), MC-VC-PAB-MMAE (Shanghai Haoyuan Biomedica, Cas#646502-53-6) y MC-GGFG-Dxd (Deruxtecan) (Shanghai Haoyuan Biomedica, Cas#HY-13631E) están comercialmente disponibles; LD-74 se sintetizó por el método sintético de WO2022228493; ELC122 se sintetizó por el método sintético de WO2021225892.

Los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) del conjugado de anticuerpo 9D1-fármaco resultante mostraron que la pureza de SEC del conjugado de anticuerpo-fármaco es mayor que 97%, sin importar si el fármaco conjugado es Exatecan, SN38, o MMAE. La pureza del conjugado de anticuerpo-fármaco del enlazador de control LD-27 es únicamente 89.22% (Cuadro 1).

Los resultados de análisis de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de conjugado de anticuerpo 9D1-fármaco mostraron que el enlazador de sal interna de la presente invención diseñado para la toxina MMAE, SN38 y Exatecan tiene un tiempo de retención de HIC significativamente más breve que el enlazador de control (excluyendo LD-74)-conjugado de anticuerpo 9D1-fármaco. El tiempo de retención del pico principal del conjugado de anticuerpo-fármaco de enlazador de sal interna-MMAE (se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco de LD-57) es aproximadamente 1 min más breve que el enlazador de control- MMAE conjugado de anticuerpo-fármaco (MC-VC-PAB-MMAE) (se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco del Ejemplo Comparativo 2) (una relación de anticuerpo a fármaco es 4) (16.07 vs 16.99), y para el ingrediente con una relación superior de anticuerpo a fármaco, el tiempo de retención se acortó más significativamente (Cuadro 1, Figuras 4A y 4B). El tiempo de retención del enlazador de sal interna-SN38 conjugado de anticuerpo-fármaco (un conjugado de anticuerpo fármaco de LD-71) es aproximadamente 4 min más breve que el tiempo de retención del enlazador de control-SN38 (ELC122, WO2021225892) conjugado de anticuerpo-fármaco (se refiere al conjugado anticuerpo fármaco del Ejemplo Comparativo 3) (12.93 vs 16.74, Cuadro 1, Figuras 5A y 5B). El tiempo de retención de HIC de los siete enlazador de sal interna-Exatecan conjugados de anticuerpo-fármaco de la presente solicitud (los conjugados de

anticuerpo-fármaco de LD-31, LD-37, LD-38, LD-65, LD-66, LD-72, LD-88, LD-89, LD-98 y LD-99) es 13.13 min a 14.17 min, significativamente más breve que el tiempo de retención del enlazador de control-Exatecan (LD-12, LD-27, MC-GGFG-Exatecan) y conjugado de anticuerpo-fármaco MC-GGFG-Dxd que no tienen una cadena lateral hidrófila, y también significativamente más breves que el tiempo de retención (16.00 min) del conjugado de anticuerpo LD-73-fármaco que tiene una cadena lateral hidrófila de polietilenglicol (PEG 9), y comparable con el tiempo de retención (13.58 min) del conjugado de anticuerpo LD-74-fármaco que tiene una cadena lateral hidrófila de polisarcosina (Cuadro 1, las Figuras 6A a 6H). Un hallazgo interesante es que, con respecto al enlazador de sal interna-Exatecan, para aquellas sales internas que tienen la misma estructura, cuanto más corta sea la distancia desde la sal interna del enlazador hasta la toxina Exatecan, más corto será el tiempo de retención de HIC del conjugado de anticuerpo-fármaco correspondiente. Por ejemplo, con respecto al enlazador de sal interna de sulfonato-Exatecan, para LD-37 (sal interna de sulfonato ubicada en la posición Z Fórmula (1-1), lejos de Exatecan), el tiempo de retención de HIC del conjugado de anticuerpo-fármaco correspondiente es 14.07 min; para LD-38 (sal interna de sulfonato ubicada en la posición Z Fórmula (1-1-1)), LD-65 (sal interna de sulfonato ubicada en la posición Fórmula Z') y LD-31(P2) (sal interna de sulfonato ubicada en la posición Fórmula Z''), los tiempos de retención de los conjugados de anticuerpo-fármaco correspondientes es de 13.57, 13.46 y 13.40 min, respectivamente, lo cual es significativamente más breve que el tiempo de retención (14.07 min) del conjugado de anticuerpo-fármaco correspondiente a LD-37 (Cuadro 1, las Figs. 6A a 6H).

La cromatografía de interacción hidrofóbica mostró las características de hidrofobicidad de los conjugados de anticuerpo-fármaco, y tal hidrofobicidad es causada por la hidrofobicidad del compuesto del fármaco conjugado. Si un conjugado de anticuerpo-fármaco tiene una fuerte hidrofobicidad, su tiempo de retención en la cromatografía de interacción hidrofóbica será más largo, entonces el conjugado de anticuerpo-fármaco tiene poca solubilidad y estabilidad en agua, y también puede eliminarse fácilmente en el cuerpo. La súper fuerte solubilidad en agua del enlazador de sal interna puede enmascarar en gran medida las características de hidrofobicidad del compuesto de fármaco, mejorar la solubilidad y estabilidad en agua y acortar el tiempo de retención en la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Adicionalmente, conjugados del enlazador de sal interna-Exatecan (LD-38) con anticuerpo monoclonal humanizado anti-receptor de folato humano (FRa) Farletuzumab, y anticuerpo monoclonal de control de isotipo IgG1 (Shanghai Biointron, cas#B117901) fueron preparados, con pureza de SEC >96%, y tiempo de retención de HIC de aproximadamente 13 min (Cuadro 1), que es comparable a aquel del correspondiente conjugado de anticuerpo 9D1-fármaco.

Los conjugados anticuerpo-fármaco 9D1 (es decir, el compuesto representado por la Fórmula 2(2) en los siguientes Ejemplos Experimentales se prepararon a partir del Ejemplo

Experimental 18.

Ejemplo Experimental 19 (una relación de fármaco a anticuerpo (DAR))

Tratamiento de Muestra:

- 5 9D1-LD-38 preparado en el Ejemplo Experimental 5a se diluyó a 1 mg/mL con Tris-HCl 0.1 M, y se agregaron 5 µL de DTT 0.5 M por 100 µg de 9D1-LD-38 para incubar en baño de agua a 37°C durante 30 min, luego agregar 1%(v/v) de 10% de TFA para terminar la reacción.

Parámetros de LC-MS:

- 10 Fase móvil A: solución acuosa 0.10% TFA y 0.02% FA; fase móvil B: solución de acetonitrilo 0.08% FA y 0.02% TFA. Gradiente de separación: fase móvil B se cambia de 20% a 32% en 2 a 4 min, se cambia de 32% a 45% en 4 a 12 min; velocidad de flujo: 0.4 mL/min. La columna cromatográfica es una columna de polifenilo BioResolve™ RP mAb (2.7 µm, 2.1 × 150 mm), temperatura de columna: 70°C.

- 15 El espectro de masas es Thermo Q Exactive Plus, el escaneo completo se realiza mediante modo de iones positivos; voltaje de pulverización: 3.8 kV; intervalo de escaneo: 500 a 3500 m/z.

Parámetros de RP-HPLC:

- 20 Fase móvil A: solución acuosa de TFA al 0.1%; fase móvil B: solución de acetonitrilo TFA al 0.1%. Gradiente de separación: la fase móvil B se cambia de 30% a 50% en 5 a 25 min; velocidad de flujo: 0.6 ml/min. La columna cromatográfica es Proteomix RP-1000 (5 µm, 4.6 x 100 mm); temperatura de columna: 60 °C.

Se muestran los resultados en el Cuadro 2 y las Figuras 7 a 9.

25 **Cuadro 2: Los pesos moleculares teóricos y pesos moleculares detectados de los ingredientes principales de 9D1-LD-38 LC/MS**

Ingredientes	Peso molecular teórico (Da)	Peso molecular detectado (Da)
LC+1*LD-38	25617.9	25617.6
HC+3*LD-38(G0F)	54610.6 50418.6	54614.1
HC+3*LD-38(G1F)	54772.8	54776.3
HC+3*LD-38(G2F)	54934.9	54939.3
HC+3*LD-38(G0)	54464.5	54466.2
HC+3*LD-38(Man5)	54382.4	54385.1

Conclusión: puede observarse a partir del Cuadro 2 y las Figs. 7 a 9, que ya que se usó cisteína para conjugar en 9D1-LD-38, se sometió a un tratamiento previo para mantener la glicosilación en un estado reducido. Los resultados muestran que, la cadena ligera y la cadena pesada

tienen cada una un componente principal. Después de la identificación del peso molecular por espectrometría de masas, la principal forma de conjugación de la cadena ligera es una molécula de LD-38, y la principal forma de conjugación de la cadena pesada son tres moléculas de LD-38. Los resultados de la deconvolución de peso molecular se muestran en las Figuras 7 a 8, que son consistentes con los pesos moleculares teóricos. Además, también se encontró apertura parcial del anillo de la molécula LD-38 y la presencia de variantes con diferentes números de conjugación de cadenas pesadas. Se calculó que el valor DAR de 9D1-LD-38 era 7.8 mediante el método de normalización con base en el área del cromatograma líquido (Figura 9), que es comparable a la relación teórica de fármaco a anticuerpo conjugado.

10

Ejemplo Experimental 20 (actividad de eliminación de célula tumoral in vitro)

1. Línea celular MC38-hClaudin18.2 positiva para Claudin18.2 humana

Los conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco preparados en los Ejemplos Experimentales y Ejemplos Comparativos anteriores se usaron para realizar prueba de eliminación in vitro en líneas celulares MC38 que expresan establemente Claudin18.2 humano. Se inocularon células MC38-hClaudin18.2 en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 3000 células/pocillo, agregando 9D1 ADC diluidos en gradiente al día siguiente para cultivar durante 48 a 72 horas. Los valores de fluorescencia de cada pocillo experimental se detectaron mediante el reactivo AlamarBlue (ThermoFisher, número de artículo DAL1100), y se calculó la viabilidad celular.

20

Se cultivaron células MC38-hClaudin18.2 en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, suplementado con 1 µg/mL de puromicina para someterlas a cultivo adherente a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Cuando la confluencia celular fue mayor al 80%, las células se pasaron en una relación de 1:10 a 1:20 cada 3 días.

25

Las células MC38-hClaudin18.2 se digirieron mediante una solución digestiva de enzima recombinante (Enzima TrypLETM Express). Después del conteo, se tomó una cantidad adecuada de células para resuspender LD-31, LD-37, LD-38, LD-65, LD-66, LD-72, LD-88, LD-89, LD-98 y LD-99) RPMI 1640+10% de FBS. La densidad celular se ajustó a 3×10^4 células/mL, inoculando en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 100 µL/pocillo. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Al día siguiente, el fármaco de prueba se diluyó 10 veces en una serie con un total de 7 a 8 puntos de concentración, estableciendo simultáneamente un control en blanco con una concentración de muestra de 0. La muestra diluida se añadió a una placa de cultivo celular de 96 pocillos que contenía células a 100 µL/pocillo, luego se incubó a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% durante 48 a 72 horas. Se agregaron 20 µL de reactivo de detección AlamarBlue a cada pocillo, se incubó a 37°C durante 4 a 6 horas, la intensidad de la señal de

35

fluorescencia se detectó en un instrumento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) multifuncional con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

- La viabilidad celular del control en blanco se estableció en 100%, y la viabilidad celular (%) del pocillo experimental se calculó mediante la siguiente fórmula:

Viabilidad celular (%) = (valor de fluorescencia del pocillo experimental/valor de fluorescencia del pocillo de control en blanco) x 100%

- La viabilidad celular promedio detectada se tomó como el eje y, se usó un método de respuesta a la dosis sigmoidea (Variable Slope) (software GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, California) para la regresión no lineal para obtener las curvas del efecto inhibitor de la proliferación celular, y se calcularon los valores CI50 correspondientes (la mitad de la concentración máxima de inhibición). Se muestran los resultados en el Cuadro 3 y la Figura 10A a 10E.

Cuadro 3: Concentración media efectiva (CI50) de muerte celular in vitro de los conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco y los conjugados de control de anticuerpo-fármaco en células MC38-hClaudin18.2

Muestras probadas	Valores CI50 (nM)
9D1-GGFG-Exatecan	11.03
9D1-LD-12	0.7993
9D1-LD-31-P1	4.353
9D1-LD-31-P2	2.909
9D1-LD-37	0.802
9D1-LD-38	1.362
9D1-LD-65	1.610
9D1-LD-66	1.094
9D1-LD-72	1.085
9D1-LD-73	1.402
9D1-LD-74	2.222
Isotipo IgG1-LD-12	NA
Isotipo IgG1-LD-38	NA
Exatecan	4.101
9D1-vc-PAB-MMAE	0.407
9D1-LD-57	0.530
MMAE	2.039
Isotipo IgG1-vc-PAB-MMAE	41.36

- Conclusión: puede observarse a partir del Cuadro 3 y las Figs. 10A a 10E, con respecto a la toxina Exatecan, en comparación con los conjugados de anticuerpo-fármaco de anticuerpos de control de isotipo IgG1 (Isotipo IgG1-LD-12, Isotipo IgG1-LD-38), los conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco muestran todos actividad de eliminación específica contra MC38-hClaudin18.2, con valores CI50 de 0.7 a 11.03 nM. En particular, 9D1-GGFG-Exatecan tiene la peor actividad farmacológica, con

CI50 de 11.03 nM. Los valores de CI50 de los conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco que tienen cadena lateral hidrófila de la sal interna son 0.8 a 4.4 nM. A excepción de 9D1-LD-31-P1, la actividad es significativamente más fuerte que la de las toxinas de molécula pequeña de Exatecan (valor CI50, 4.10 nM).

5 Con respecto a la toxina MMAE, los conjugados de anticuerpo-fármaco de anticuerpo control de isotipo IgG1 (Isotipo IgG1-VC-PAB-MMAE) muestran un valor CI50 de 41.3 nM en MC38-hClaudin18.2, mientras que los conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco (9D1 vc-PAB MMAE y 9D1 LD-57) muestran muerte específica, con valores CI50 de 0.41 nM y 0.53 nM, respectivamente.

2. Línea celular NUGC4-hClaudin18.2 positiva para Claudin18.2 humana

10 Se cultivaron células NUGC4 (NUGC4-hClaudin18.2) de la línea celular de cáncer gástrico humano que expresaba establemente Claudin18.2 humano en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, suplementado con 1 µg/mL de puomicina para someterlas a cultivo adherente a 37°C en incubadora con CO₂ al 5%. Cuando la confluencia celular fue superior al 80%, las células se pasaron en una relación de 1:3 a 1:10 cada 3 a 4 días.

15 Las células NUGC4-hClaudin18.2 se digirieron mediante una solución digestiva de enzima recombinante (Enzima TrypLETM Express). Después del conteo, se tomó una cantidad adecuada de células para resuspenderlas con RPMI 1640+10% de FBS. La densidad celular se ajustó a 3×10^4 células/mL, inoculando en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 100 µL/pocillo. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Al día siguiente, se
20 diluyeron 9D1 ADC y toxina de pequeño peso molecular 5 veces en una serie desde 1000 nM (concentración final, 500 nM) con un total de 7 a 8 puntos de concentración, estableciendo simultáneamente un control negativo con una concentración de muestra de 0, y a control en blanco que contiene sólo medio sin células. La muestra diluida se agregó a una placa de cultivo celular de 96 pocillos que contenía células a 100 µL/pocillo (dos pocillos duplicados), y luego se incubó a 37°C en
25 una incubadora con CO₂ al 5% durante 120 horas. Se agregaron 20 µL de reactivo de detección CCK-8 (Dongren Chemical, CAS# CK04) a cada pocillo, incubando a 37°C durante 3 a 4 horas. Los valores de OD de cada pocillo en la placa de ELISA se midieron a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm en un lector multifuncional de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), para cada pocillo, valor de OD = OD_{450 nm} - OD_{630 nm}. La viabilidad
30 celular del control negativo se estableció en 100% y la viabilidad celular (%) de los pocillos experimentales se calculó según la siguiente fórmula.

Viabilidad celular (%) = (valor de OD del pocillo experimental - valor de OD del pocillo en blanco)/(valor de OD del pocillo de control negativo - valor de OD del pocillo de control en blanco) x 100%

35 La regresión no lineal se realizó mediante el método sigmoide de respuesta a la dosis

(Variable Slope) (software GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, California), calculando los valores de CI50 correspondientes (la mitad de la concentración inhibidora máxima). Se muestran los resultados en el Cuadro 4.

5 **Cuadro 4: Concentración media efectiva de eliminación celular in vitro (CI50) del conjugado de anticuerpo D1-fármaco y el conjugado de anticuerpo-fármaco de control en células NUGC4-hClaudin18.2**

Muestras de prueba	Valores CI50 (nM)
9D1-GGFG-Exatecan	0.184
9D1-LD-12	0.580
9D1-LD-38	0.728
9D1-LD-65	0.701
9D1-LD-66	0.996
9D1-LD-72	0.553
9D1-LD-73	1.273
9D1-LD-74	1.155
Isotipo IgG1-LD-38	141.3
Exatecan	2.013
9D1-vc-PAB-MMAE	0.064
9D1-LD-57	0.053
MMAE	0.0019

Conclusión: se puede observar a partir del Cuadro 4, con respecto a la toxina Exatecan, comparada con el conjugado de anticuerpo-fármaco de anticuerpo control de isotipo IgG1 (Isotipo IgG1-LD-38, CI50 141.3 nM), los conjugados de anticuerpo-fármaco 9D1 todos muestran actividad de aniquilación específica contra NUGC4-hClaudin18.2, con valores CI50 de 0.18 a 1.27 nM. Los valores CI50 (0.55~1.00 nM) de los conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco que tienen una cadena lateral hidrófila de la sal interna son superiores a los de aquellos conjugados de anticuerpo-fármaco que tienen una cadena lateral hidrófila de polietilenglicol (PEG, 9D1-LD-73, CI50 1.27 nM) y polisarcosina (PSAR, 9D1-LD-74, CI50 1.16 nM).

Con respecto a una toxina MMAE, el valor CI50 del conjugado de anticuerpo-fármaco 9D1-LD-57 que tiene una cadena lateral hidrófila de la sal interna y el valor CI50 del control conjugado de anticuerpo-fármaco 9D1-vc-PAB-MMAE son comparables, y son 0.05 nM y 0.06 nM, respectivamente.

3. Línea celular HEK293-hClaudin18.2 positiva para Claudin18.2 humana

Se cultivaron células HEK293-hClaudin18.2 en medio DMEM que contenía FBS al 10%, suplementado con 250 µg/mL de G418 para someterlas a cultivo adherente a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Cuando la confluencia celular fue mayor al 80%, las células se pasaron en una relación de 1:20 a 1:40 cada 3 días.

Las células HEK293-hClaudin18.2 se digirieron mediante una solución digestiva de

enzima recombinante (Enzima TrypLETM Express). Después del conteo, se tomó una cantidad adecuada de células para resuspenderlas con DMEM+10% de FBS. La densidad celular se ajustó a 2×10^4 células/mL, inoculando en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 100 μ L/pocillo. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Al día siguiente, 9D1 ADC y

5 toxina de pequeño peso molecular se diluyeron 10 veces en una serie desde 1000 nM (concentración final, 500 nM) con un total de 7 a 8 puntos de concentración, estableciendo simultáneamente un control negativo con una concentración de muestra de 0, y un control en blanco que contiene sólo el mismo volumen (200 μ L/pocillo) de células sin medio. La muestra diluida se añadió a una placa de cultivo celular de 96 pocillos que contenía células a razón de 100 μ L/pocillo (dos pocillos duplicados),

10 y luego se incubó a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% durante 72 horas. La viabilidad celular se detectó mediante el método de detección AlamarBlue mencionado anteriormente, luego se procesaron los datos para calcular los valores CI50, y se muestran los resultados en el Cuadro 5 a continuación.

Cuadro 5: Concentración media efectiva de muerte celular in vitro (CI50) del conjugado de anticuerpo-fármaco 9D1 y el conjugado de anticuerpo-fármaco de control sobre células HEK293-hClaudin18.2

Muestras de prueba	Valores CI50 (nM)
9D1-LD-38	0.090
9D1-LD-65	0.086
9D1-LD-66	0.996
Isotipo IgG1-LD-38	688.2
Exatecan	0.508
9D1-LD-71	0.397
9D1-ELC122	0.628
Isotipo IgG1-ELC122	NA

Nota: NA indica no aplicable

20 Conclusión: puede observarse a partir del Cuadro 5, con respecto a la toxina Exatecan, comparada con el conjugado de anticuerpo-fármaco de anticuerpo de control de isotipo IgG1 (Isotipo IgG1-LD-38, CI50 688.2 nM), los conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco que tienen una cadena lateral hidrófila de la sal interna, todos muestran actividad de eliminación específica contra HEK293-hClaudin18.2, con valores CI50 de 0.09 a 1.00 nM, y el valor CI50 del Exatecan de pequeño peso

25 molecular es de 0.51 nM.

Con respecto a la toxina SN38, en comparación con el conjugado de anticuerpo-fármaco de anticuerpo de control de isotipo IgG1 (Isotipo IgG1-ELC122, sin aniquilación), el conjugado de anticuerpo 9D1-fármaco mostró actividad de eliminación específica contra HEK293-hClaudin18.2. La eliminación del conjugado de anticuerpo 9D1-fármaco (9D1-LD-57) que tiene cadena lateral

hidrófila de la sal interna es un poco más fuerte que la del control (9D1-ELC122), sus valores CI50 son 0.40 y 0.63 nM, respectivamente.

Ejemplo Experimental 21 (Efecto terapéutico de tumor in vivo)

- 5 1. Modelo de tumor de xenoinjerto de ratón de la línea celular MC38-hClaudin18.2 positiva para Claudin18.2 humano

Ratones C57BL/6, hembras, de 5 a 6 semanas de edad, comprados de Shanghai Lingchang Biotech. Los animales se mantuvieron en la cabina de flujo laminar de la sala de animales SPF, con 5 animales por jaula y 12 horas de exposición a luz alterna. Los animales pueden beber y alimentarse libremente. La línea celular colorrectal de cáncer de ratón MC38 Claudin18.2, que expresa de manera estable Claudin18.2 humano, se cultivó en medio RPMI 1640 que contenía FBS (suero bovino fetal) al 10% para someterla a cultivo adherente en matraces T75 a 37°C en incubadora de CO₂ al 5%, y las células se pasaron cada tres días. Se recolectaron células MC38 h Claudin18.2 en fase de crecimiento logarítmico, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, y se resuspendieron en PBS. Se mezclaron 2 x 10⁶ células con gel de matriz en una relación de volumen de 1:1 para inocularlas por vía subcutánea en ratones C57BL/6. Cuando el volumen del tumor alcanza 100 a 150 mm³, los ratones se agruparon y se les administraron los conjugados (5 a 6 ratones/grupo). Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana, luego se calcularon los volúmenes de los tumores (TV, mm³), y se trazaron las curvas de crecimiento de los tumores.

- 20 TV (mm³)=(L×W²)/2; L representa la longitud del tumor, y W representa el ancho del tumor

Tasa de inhibición tumoral (%) = (grupo de control de TV-grupo de administración de TV) × 100/grupo de control de TV

- 25 Los días posteriores a la primera administración se usaron como el eje x, el volumen del tumor se usó como el eje y, y se usó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California) para trazar las curvas tumorales del ratón en modo XY. Se usó ANOVA de dos vías para analizar si existían diferencias estadísticas entre cada grupo experimental y el grupo de PBS de control de vehículo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, y ****p<0.0001.

- 30 Los esquemas terapéuticos del conjugado de anticuerpo 9D1-fármaco conjugado con Exatecan en el modelo de tumor subcutáneo de ratón MC38-hClaudin18.2 se enlistan en el Cuadro 6. Los efectos terapéuticos sobre el tumor y las correspondientes curvas de crecimiento tumoral se muestran en el Cuadro 6 y las Figuras 11A a 11C.

Cuadro 6: Agrupamiento, regímenes de administración y las tasas de inhibición tumoral después del tratamiento farmacológico del modelo de tumor subcutáneo de ratón MC38-hClaudin18.2

Agrupamiento	Vía de administración	Dosis de administración (mg/kg)	Tiempos de Administración	Tasa de inhibición tumoral (%)
PBS de Control	i.p.	/	1	NA
9D1-ELC122	i.p.	10	1	39.82
9D1-GGFG-Exatecan	i.p.	10	1	48.34
9D1-LD12	i.p.	10	1	48.63
PBS de Control	i.p.	/	1	NA
9D1-LD-31-P1	i.p.	10	1	27.8%
9D1-LD-31-P2	i.p.	10	1	80.0%
9D1-LD-37	i.p.	10	1	37.4%
9D1-LD-38	i.p.	10	1	80.6%
PBS de Control	i.p.	10	Qw x 2	NA
9D1-GGFG-Dxd	i.p.	10	Qw x 2	50.0%
9D1-LD-38	i.p.	10	Qw x 2	98.0%
IgG1 Isotipo-LD-38	i.p.	10	Qw x 2	27.2%
PBS de Control	i.p.	/	1	NA
9D1-LD-65	i.p.	5	1	71.7%
9D1-LD-66	i.p.	5	1	48.0%
9D1-LD-72	i.p.	5	1	42.3%
9D1-LD-73	i.p.	5	1	47.0%
9D1-LD-74	i.p.	5	1	56.5%
9D1-LD-38	i.p.	5	1	39.2%
IgG1 Isotipo-LD-38	i.p.	5	1	5.5%

5 Nota: i.p.: inyección intraperitoneal, administración intraperitoneal; NA: no aplicable.

Conclusión: puede observarse a partir del Cuadro 6 y las Figs. 11A a 11C, bajo la condición de una dosificación de administración única de 10 mg/kg, crecimiento del tumor tratado con los conjugados de anticuerpo-fármaco control (9D1-ELC122, 9D1-GGFG -Exatecan, y 9D1-LD-12) se reduce (Figura 11A) al final del experimento, y sus tasas de inhibición tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) son 39.82%, 48.34% y 48.63%, respectivamente. Los conjugados de anticuerpo-fármaco con un enlazador que tiene un grupo de sal interna (9D1-LD-31-P2 y 9D1-LD-38) exhibe un efecto terapéutico superior sobre el tumor (Figura 11B), y sus TGI son 80.0% y 80.6%, respectivamente.

En las condiciones de 10 mg/kg, administrados una vez por semana para un total de 2 dosis, al final del experimento, la tasa de inhibición tumoral del conjugado de anticuerpo-fármaco 9D1-GGFG-Dxd de control es del 50.0%, mientras que el tumor de 9D1-LD-38 se elimina casi por

completo (la tasa de inhibición tumoral es del 98.0%). El conjugado de anticuerpo-fármaco de control homólogo (IgG1 Isotipo LD-38) sólo muestra un leve efecto inhibidor tumoral (Cuadro 6).

Con el fin de comparar aún más y distinguir los efectos terapéuticos tumorales de otros conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco que tienen grupos de sal interna, se eligió una dosis baja (5 mg/kg) para los experimentos de eficacia del fármaco y se estableció 9D1-LD-38 como la referencia interna. Bajo la condición de administración de dosis bajas (5 mg/kg), el conjugado de anticuerpo-fármaco de control de isotipo (IgG1 Isotipo LD-38) no muestra un efecto terapéutico tumoral significativo. El efecto terapéutico tumoral de 9D1-LD-38 es significativo, con un TGI del 39.2%. El efecto terapéutico tumoral de otros conjugados de anticuerpo 9D1-fármaco con un enlazador que tiene grupo de sal interna (9D1-LD-65, 9D1-LD-66, y 9D1-LD-72) es mejor (Figura 11C), con TGIs de 71.7%, 48.0% y 42.3%, respectivamente. Especialmente para 9D1-LD-65, el efecto de inhibición tumoral es óptimo, y las curvas de inhibición del crecimiento tumoral (Figura 11C) y TGI son incluso significativamente mejores que los conjugados de anticuerpo-fármaco 9D1 reportados con un enlazador que tiene otros grupos solubles en agua, tal como el control 9D1-LD-73 (TGI 47.0%) que tiene un grupo soluble en agua polietilenglicol (PEG) y el control 9D1-LD-74 (TGI 56.5%) que tiene un grupo soluble en agua polisarcosina (PSAR).

En resumen, la eficacia de los conjugados de anticuerpo-fármaco 9D1 con un enlazador que tiene un grupo soluble en agua con sal interna (9D1-LD-31-P2, 9D1-LD-38, 9D1-LD-65, 9D1-LD-66, y 9D1-LD-72) es significativamente mejor que el de los conjugados de anticuerpo-fármaco clásicos con un enlazador que no tiene grupo soluble en agua, tal como 9D1-ELC122, 9D1-GGFG-Exatecan, y 9D1-LD12. Especialmente para 9D1-LD-65, 9D1-LD-66, y 9D1-LD-72, el efecto terapéutico tumoral es comparable o mejor que el de los conjugados de anticuerpo-fármaco 9D1 con un enlazador que tiene otros tipos de grupos solubles en agua (9D1-LD-73 que tiene PEG, y 9D1-LD-74 que tiene PSAR); por ejemplo, 9D1-LD-65.

2. Modelo de tumor de xenoinjerto de ratón de la línea celular NUGC4-hClaudin18.2 positiva para Claudin18.2 humano

La línea celular de cáncer gástrico NUGC4 hClaudin 18.2, que expresa de manera estable la proteína de densidad humana 18.2, se cultivó en medio RPMI-1640 que contenía 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C, incubadora de CO₂ al 5%. Después de que las células crecieron completamente cada 4 a 5 días, se subcultivaron en botellas. Se usaron células tumorales en fase de crecimiento logarítmico para la inoculación de tumores in vivo.

Se ajustaron células tumorales NUGC4 hClaudin18.2 a una concentración de 5×10^7 /mL con PBS:Matriz (relación de volumen 1:1) y se inocularon por vía subcutánea en la costilla derecha de ratones BALB/c nu/nu (hembra, 6 a 7 de semanas) a una dosis de 100 µL/ratón, con un volumen de

inoculación de células tumorales de 5×10^6 células/ratón. Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 150 mm^3 , los ratones fueron dosificados en grupos. Los grupos y regímenes de administración se muestran en el Cuadro 7. Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana, luego se calcularon los volúmenes de los tumores (TV, mm^3) y se trazaron las curvas de crecimiento de los tumores.

$TV (\text{mm}^3) = (L \times W^2)/2$, L representa la longitud del tumor, y W representa el ancho del tumor

Los días posteriores a la primera administración se usó como el eje x, el volumen del tumor se usó como el eje y, y se usó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California) para trazar las curvas tumorales del ratón en modo XY. Se muestran los resultados en la Figura 12.

Cuadro 7: Agrupación y regímenes de administración del modelo de tumor subcutáneo de ratón NUGC4-hClaudin18.2

Grupos	Fármacos de prueba	Número de animales	Dosificación (mg/kg)	Vía de administración	Frecuencia de administración
1	9D1-LD-38	6	5	i.p	QW x 3
2	Anticuerpo no conjugado 9D1	6	5	i.p	QW x 3
3	9D1-ELC-122	6	5	i.p	QW x 3
4	9D1-GGFG-Exatecan	6	5	i.p	QW x 3
5	Isotipo-LD-38	6	5	i.p	QW x 3
6	PBS	6	5	i.p	QW x 3

Nota: i.p: inyección intraperitoneal; QW X 3: administración una por semana, para un total de tres veces.

Conclusión: puede observarse a partir del Cuadro 7 y la Fig. 12 que, bajo la condición de, administrado una vez por semana a 5 mg/kg con un total de tres veces, 9D1-LD-38 con un enlazador que tiene un grupo soluble en agua de sal interna muestra el mejor efecto terapéutico, significativamente mejor que 9D1-ECL-122 y 9D1-GGFG-Exatecan. Después de 24 días de tratamiento, el tumor básicamente desaparece en el grupo de tratamiento con 9D1-LD-38, mientras que el crecimiento del tumor se inhibe en el grupo de tratamiento con 9D1-GGFG-Exatecan, pero no se observa reducción del tumor. El 9D1-ECL-122 sólo muestra un débil efecto inhibitor tumoral, lo que puede deberse a que la toxina del 9D1-ECL-122 es la SN38 menos tóxica.

3. Modelo tumoral de xenoinjerto de ratón de células OVCAR-3 positivas para receptor de folato

Se cultivaron células tumorales de cáncer de ovario humano OVCAR-3 que expresan el receptor de folato (FRa) en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal inactivado al 20%,

penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C. Después de que las células crecieron completamente, se subcultivaron cada 4 a 5 días en botellas, y las células tumorales en fase de crecimiento logarítmico se usaron para la inoculación de tumores in vivo.

Las células tumorales OVCAR3 se ajustaron a una concentración de 1×10^8 /mL con PBS:Matriz (relación de volumen 1:1) y se inocularon por vía subcutánea en la costilla derecha de ratones experimentales M-NSG a 100 µL/ratón, con un volumen de inoculación de células tumorales de 1×10^7 /ratón.

Cuando el tumor creció hasta un volumen de aproximadamente 150 mm³, los ratones se agruparon para la administración (5 ratones/grupo), en donde al grupo control (Control) se le administró con PBS, y al grupo de tratamiento se le administró con un conjugado de anticuerpo-fármaco del anticuerpo monoclonal humanizado de anti-receptor de folato humano (FRa), Farletuzumab-LD-38, a una dosis de 5 mg/kg en administración de dosis única. Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana, luego se calcularon los volúmenes de los tumores (TV, mm³) y se trazaron las curvas de crecimiento de los tumores.

TV (mm³) = $(L \times W^2)/2$, L representa la longitud del tumor, y W representa el ancho del tumor

Tasa de inhibición tumoral (%) = $(\text{grupo de control de TV} - \text{grupo de administración de TV}) \times 100 / \text{grupo de control de TV}$

Los días posteriores a la primera administración se usaron como el eje x, el volumen del tumor se usó como el eje y, y se usó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California) para trazar las curvas tumorales del ratón en modo XY. Se usó ANOVA de dos vías para analizar si existían diferencias estadísticas entre cada grupo experimental y el grupo de control de vehículo PBS. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, y ****p<0.0001. Se muestran los resultados en la Figura 13.

Conclusión: puede observarse a partir de la Fig. 13, una semana después de la administración única a 5 mg/kg, conjugado de anticuerpo-fármaco Farletuzumab-LD-38 muestra inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control, y posteriormente muestra reducción del tumor. El día 24, la tasa de inhibición tumoral (TGI) alcanza el 93.5%, lo que es significativamente diferente del grupo de control.

4. Modelo tumoral de xenoinjerto de ratón de células IGROV1 positivas para receptor de folato

Se cultivaron células tumorales de cáncer de ovario humano IGROV1 que expresan el receptor de folato (FRa) en medio DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C. Después de que las células crecieron completamente, se subcultivaron cada 3 a 4 días en botellas, y las células tumorales

en fase de crecimiento logarítmico se usaron para la inoculación de tumores in vivo.

Las células tumorales IGROV1 se ajustaron a una concentración de 1×10^8 /mL con PBS y se inocularon por vía subcutánea en la costilla derecha de ratones experimentales nude BALB/c a 100 μ L/ratón, con un volumen de inoculación de células tumorales de 1×10^7 /ratón.

5 Cuando el tumor creció hasta un volumen promedio de aproximadamente 150 mm³, los ratones se agruparon para la administración (el día de agrupamiento se registró como D0), y cada modelo se dividió uniformemente en 2 grupos, 5 ratones/grupo, en donde el grupo control (Control) se administró con PBS, y al grupo de tratamiento se le administró un conjugado de anticuerpo-fármaco de anticuerpo monoclonal humanizado anti-receptor de folato humano (FRa), Farletuzumab-LD-38, a 10 una dosificación de 5 mg/kg, administrado una vez por semana con un total de dos veces. Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana, luego se calcularon los volúmenes de los tumores (TV, mm³) y se trazaron las curvas de crecimiento de los tumores.

TV (mm³)=(L×W²)/2, L representa la longitud del tumor, y W representa el ancho del tumor

15 Tasa de inhibición tumoral (%) = (grupo de control de TV-grupo de administración de TV) × 100/grupo de control de TV

Los días posteriores a la primera administración se usó como el eje x, el volumen del tumor se usó como el eje y, y se usó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California) para trazar las curvas tumorales del ratón en modo XY. Se usó ANOVA de dos vías para 20 analizar si existían diferencias estadísticas entre cada grupo experimental y el grupo de control de vehículo PBS. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, y ****p<0.0001.

Se muestran los resultados en la Figura 14, después de administrar una vez a la semana, a 5 mg/kg con un total de dos veces de dosis, el conjugado de anticuerpo-fármaco de Farletuzumab-LD-38 muestra una rápida contracción del tumor en comparación con el grupo control. 25 con una tasa de inhibición tumoral (TGI) del 100% el día 30, y mantiene la eficacia 50 días después de la administración.

Ejemplo Experimental 22: Farmacocinética en ratas

Se seleccionaron tres ratas SD macho para el experimento y se dividieron 30 aleatoriamente en tres grupos. Se les administró una única inyección intravenosa de muestras de prueba que incluían 9D1-LD-38 preparada en el Ejemplo Experimental y 9D1-GGFG-Exatecan preparado en el Ejemplo Comparativo, cada una con una dosis de 10 mg/kg. Antes de la administración, y 5 minutos, 1 hora, 5 horas, 24 horas (D2), 48 horas (D3), 120 horas (D6), 168 horas (D8), 240 horas (D11), 336 horas (D15), y 504 horas (D22) después de la administración, se recolectó 35 sangre completa de los animales de cada grupo de prueba y se separó el suero y el plasma. Se usó el

método ELISA para analizar las concentraciones de Ab (anticuerpo) y ADC (anticuerpo conjugado) totales de cada muestra de prueba en muestras de suero. Los parámetros farmacocinéticos de cada animal se calcularon mediante el modelo de análisis no compartimental (NCA, por sus siglas en inglés) de PK Solver.

5 Se usó el método de detección de anticuerpo total y anticuerpo conjugado: ELISA para determinar la concentración sanguínea del fármaco de anticuerpo total y anticuerpo conjugado. El método específico fue el siguiente:

a) El anti-IgG humano (Fab)₂ se diluyó a 1 µg/mL con PBS, recubriendo la placa ELISA de 96 pocillos a 100 µL/pocillo, y dejándola durante la noche a 4°C.

10 b) La placa se lavó tres veces, bloqueando con 3% de BSA-PBST durante 2 horas a 300 µL/pocillo a temperatura ambiente.

c) La placa se lavó tres veces, diluyendo el suero blanco de rata 9D1-LD-38/9D1-GGFG-Exatecan en una relación de 2 veces, con la concentración inicial de 1 µg/mL para un total de 7 concentraciones. Adicionalmente, el suero blanco de rata se estableció como el punto "0". Al mismo tiempo, las muestras en diferentes momentos después de la administración se diluyeron con suero blanco de rata en múltiplos apropiados. Todas las muestras anteriores se diluyeron adicionalmente 50 veces (para 9D1-GGFG-Dxd) y 100 veces (para 9D1-LD-38) con 1% de BSA-PBST, luego se agregaron a la placa ELISA a 100 µL/pocillo para incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

d) La placa se lavó 6 veces.

20 Detección del anticuerpo total: Se diluyó HRP IgGFC antihumano de oveja con 1% de BSA-PBST en una relación de 1:20000, se agregó a la placa ELISA a 100 µL/pocillo para incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

Detección de ADC: el anticuerpo anti-exatecan se diluyó con 1% de BSA-PBST a 0.5 µg/mL, luego se agregó a la placa ELISA a 100 µL/pocillo para incubar durante 1 hora a temperatura ambiente; lavando la placa por 6 veces, y HRP IgG anti-ratón de oveja (H+L) se diluyó con 1% de BSA-PBST en una relación de 1:20000, se agregó a la placa ELISA a 100 µL/pocillo para incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

La placa se lavó 6 veces, luego se agregó TMB a la placa a 100 µL/pocillo, y se reprodujo el color durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

30 La solución de terminación se añadió a 50 µL/pocillo y la detección se realizó en la placa ELISA (la longitud de onda es 450/630 nm). Se muestran los resultados en el Cuadro 8 y la Figura 15.

Cuadro 8: Los parámetros farmacocinéticos de 9D1-LD-38 y 9D1-GGFG-Exatecan en ratas

Parámetros PK	Unidad	9D1-LD-38		9D1-GGFG-Exatecan	
		Ab Total	ADC	Ab Total	ADC
<i>t_{1/2}</i>	h	145.4	119.8	65.1	57.8
<i>C_{max}</i>	µg/mL	482.51	428.64	613.84	533.28
<i>AUC</i>	µg/mL*h	37883.16	29359.05	34804.63	23434.00
<i>Cl_{obs}</i>	mL/kg/h	0.26	0.34	0.29	0.43
<i>V_{ss_obs}</i>	(mL/kg)	40.3	39.2	23.8	29.7

Conclusión: puede observarse a partir del Cuadro 8 y la Fig. 15, bajo la condición de inyección intravenosa única a 10 mg/kg a ratas, las concentraciones séricas del fármaco del anticuerpo total y del anticuerpo conjugado (ADC) de 9D1-GGFG-exatecan disminuye rápidamente (Figura 15), con una vida media más corta de 65.1 h y 57.8 h, respectivamente. La relación AUC del anticuerpo conjugado con respecto al anticuerpo total es 0.67.

La tendencia a la disminución de las concentraciones séricas del fármaco para el anticuerpo total y el anticuerpo conjugado de 9D1-LD-38 es relativamente lenta (Figura 15), con una vida media de 145.4h y 119.8h, respectivamente. La relación AUC del anticuerpo conjugado con respecto al anticuerpo total es 0.78.

La vida media del anticuerpo conjugado 9D1-LD-38 es 2 veces mayor que aquella del 9D1-GGFG-Exatecan; el AUC del anticuerpo conjugado 9D1-LD-38 es 1.3 veces mayor que el del 9D1-GGFG-Exatecan. La relación AUC del anticuerpo conjugado 9D1-LD-38 con respecto al anticuerpo total es mayor que la relación AUC del 9D1-GGFG-Exatecan con respecto al anticuerpo total (0.78 vs 0.67), lo que indica que 9D1-LD-38 es más estable, y es menos probable que la molécula pequeña se desprenda.

En resumen, la eliminación del fármaco de 9D1-LD-38 con un enlazador que tiene un grupo soluble en agua de sal interna es significativamente más débil en ratas que la de 9D1-GGFG-Exatecan con un enlazador sin grupo soluble en agua, y su estabilidad in vivo es mejor, manifestado por una vida media significativamente prolongada de 9D1-LD-38, un aumento significativo en la exposición al fármaco, y una relación AUC más alta del anticuerpo conjugado con respecto al anticuerpo total.

25

Ejemplo experimental 23: Efectos de eliminación celular *in vitro* de 9D1-LD-38, 9D1-LD-82, 9D1-LD-88 y 9D1-LD-89

Las células MC38-hClaudin18.2 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Thermo, Cat# 11875-085) que contenía 10% de FBS (Thermo, Cat# 10099-141C), suplementado con 1 µg/mL de puromicina (Thermo, Cat# A11138-03), y se mantuvieron en cultivo adherente a 37 °C en una

30

incubadora con 5% de CO₂. Cuando la confluencia celular superó el 80%, las células se pasaron a una proporción de 1:10 a 1:20 cada 3 días.

Las células MC38-hClaudin18.2 se digirieron con una solución digestiva de enzima recombinante (TrypLETM Express Enzyme, Thermo, Cat# 12605028). Tras el recuento, se tomó una
 5 cantidad adecuada de células y se resuspendió en RPMI 1640 + 10% FBS. La densidad celular se ajustó a 1.5×10^4 células/mL y se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos a 100 µL/pocillo. Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Al día siguiente, 9D1-LD-38, 9D1-LD-82, 9D1-LD-88 y 9D1-LD-89 se diluyeron respectivamente en series de dilución 10 veces a partir de una concentración de 500 nM, con un total de 7–8 puntos de
 10 concentración, simultáneamente, se estableció un control negativo con una concentración de muestra de 0 y un control en blanco con el mismo volumen (200 µL/pocillo) de medio de cultivo sin células. Las muestras diluidas se añadieron a las placas de 96 pocillos que contenían células a 100 µL/pocillo y se incubaron a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂ durante 72 horas. Se añadieron 20 µL del reactivo de detección AlamarBlue (Thermo, Cat: DAL1100) a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante
 15 6 horas. La intensidad de la señal de fluorescencia se detectó en un lector ELISA multifuncional (Molecular Devices, M5) con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La viabilidad celular del control negativo se estableció como 100%, y la viabilidad celular (%) de los pocillos experimentales se calculó según la siguiente fórmula:

Viabilidad celular (%) = (valor de OD del pocillo experimental – valor de OD del pocillo
 20 en blanco) / (valor de OD del pocillo de control negativo – valor de OD del pocillo de control en blanco) × 100%

El logaritmo de la concentración del ADC se utilizó como eje x y la viabilidad celular como eje y y se empleó el método de respuesta dosis–sigmoide (pendiente variable) (GraphPad Software, San Diego, California) para la regresión no lineal y obtener las curvas de efecto de inhibición
 25 de la proliferación celular, como se muestra en la Fig. 16.

Conclusión: Como se puede observar a partir de la Fig. 16, 9D1-LD-38, 9D1-LD-82, 9D1-LD-88 y 9D1-LD-89 pueden inhibir la proliferación de las células MC38-hClaudin18.2 de manera dependiente de la dosis, los efectos inhibidores de 9D1-LD-38, 9D1-LD-88 y 9D1-LD-89 son comparables (sus valores de IC₅₀ son 0.632; 1.458 y 0.757 nM, respectivamente), mientras que 9D1-
 30 LD-82 es ligeramente menos potente (el valor IC₅₀ = 8.013 nM).

Ejemplo experimental 24: Inducción de células B16F10-hClaudin18.2 para generar muerte celular inmunogénica

Las células B16F10-hClaudin18.2 se reactivaron y se cultivaron en medio DMEM
 35 (Thermo, Cat#: 10569044) + 10% FBS (Thermo, Cat#: 10099-141C) + 0.5 µg/mL de puromicina,

manteniéndose en cultivo adherente a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Cuando la confluencia celular fue superior al 80%, las células se pasaron a una proporción de 1:10 a 1:20 cada 3–4 días.

Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 80% de confluencia, se digirieron con una solución digestiva de enzima recombinante (TrypLETM Express Enzyme, Thermo, Cat# 12605028). Luego, las células se resuspendieron en DMEM + 10% FBS y se tomó un volumen
5 adecuado para el recuento. La densidad celular se ajustó a 1×10^4 células/mL y se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos a 100 µL/pocillo, cultivándose durante la noche a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Al día siguiente, el fármaco ADC se diluyó con medio DMEM + 10% FBS hasta una concentración final de 750 nM, la toxina de pequeña molécula Exatecan se diluyó hasta una
10 concentración final de 10 nM, y se estableció una concentración de muestra de 0 como control de blanco. Las muestras diluidas se añadieron respectivamente a las placas de cultivo celular de 96 pocillos que contenían células a 100 µL/pocillo y se incubaron a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂ durante 48 horas. Tras retirar la placa de 96 pocillos de la incubadora, las células se digirieron con Accutase (Thermo, Cat# 00-4555-56), se lavaron una vez con PBS con 1% FBS y luego se añadió
15 el anticuerpo Anti-Calreticulina-Alexa Fluor 647 (Abcam, Cat# AB196159, diluido en PBS con 1% FBS en una proporción de 1:100) a 100 µL/pocillo, incubándose en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces con PBS con 1% FBS, se añadieron 2 µl de colorante PI (Thermo, Cat# 00-4555-56) a cada muestra y se incubó en la oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se realizó la detección mediante FACS (Beckman, CytoFLEX)
20 en el instrumento y se trazaron las curvas basadas en la proporción de células Calreticulina (+)/PI (–), como se muestra en la Fig. 17.

Conclusión: Como se observa en la Fig. 17, cuando la concentración del ADC es de 750 nM, en comparación con el ADC de control, la proporción de células Calreticulina (+)/PI (–) en los grupos de tratamiento con 9D1-LD-38/9D1-GGFG-Dxd aumenta significativamente, siendo mayor
25 en el grupo 9D1-LD-38 que en el grupo 9D1-GGFG-Dxd; cuando la concentración del fármaco de pequeña molécula Dxd es de 10 nM, la proporción de células Calreticulina (+)/PI (–) aumenta de forma significativa, y Exatecan (MCE, Cat# HY-13631A) > Dxd (MCE, Cat# HY-13631D). Estos resultados muestran que, en comparación con 9D1-GGFG-Dxd, 9D1-LD-38 puede inducir una muerte celular inmunogénica más potente, proporcionando una base teórica para su combinación con
30 inhibidores de puntos de control inmunitario.

Ejemplo experimental 25: Eliminación de activación inespecífica en células HEK293-hClaudin18.2/HEK293

Método de detección AlamarBlue: Las células positivas para hClaudin18.2 HEK293-
35 hClaudin18.2 y las células negativas HEK293 se reactivaron y se cultivaron respectivamente en medio

DMEM + 10% FBS + 250 µg/mL G418 y en DMEM + 10% FBS, manteniéndose en cultivo adherente a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Cuando la confluencia celular superó el 80%, las células se pasaron a una proporción de 1:10 a 1:20 cada 3–4 días.

Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 80% de confluencia, las células
 5 positivas y negativas se digirieron con una solución digestiva de enzima recombinante (TrypLETM Express Enzyme). Tras el recuento, se tomó una cantidad adecuada de suspensión celular, se centrifugó y se resuspendió en DMEM + 10% FBS. La densidad celular se ajustó a 5×10^3 células/mL. Tanto el grupo de células positivas como el grupo de células negativas se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos a 100 µL/pocillo. Los grupos mixtos de células positivas y negativas se
 10 mezclaron bien en una proporción de volumen 1:1, luego se sembraron en placas de 96 pocillos a 200 µL/pocillo, cultivándose durante la noche a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Al día siguiente, el fármaco ADC se diluyó con medio DMEM + 10% FBS hasta una concentración final de 0.5 nM, estableciéndose una concentración de muestra de 0 como control de blanco. Para el grupo mixto de células positivas y negativas, se descartaron 100 µL de medio de cultivo por pocillo y luego se añadió
 15 el fármaco ADC diluido a las placas de cultivo de células de 96 pocillos que contenían células a 100 µL/pocillo, incubándose durante 120 horas a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Tras retirar la placa de cultivo celular de 96 pocillos de la incubadora, se añadieron 20 µL del reactivo de detección AlamarBlue (Thermo, Cat# DAL1100) a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 4 horas, la intensidad de la señal de fluorescencia se midió en un instrumento (ELISA) de ensayo inmunoabsorbente ligado
 20 a enzima multifuncional, con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

La viabilidad celular del control de blanco se estableció como 100%, y la viabilidad celular (%) se calculó según la siguiente fórmula:

Viabilidad celular (%) = (valor de fluorescencia del pocillo experimental / valor de
 25 fluorescencia del pocillo de control de blanco) $\times$ 100%

Método de detección por FACS: Las células HEK293 se marcaron, tras contar las células HEK293 en fase de crecimiento logarítmico, se tomó una cantidad adecuada de suspensión celular, se centrifugó y se lavó dos veces con PBS, luego la densidad se ajustó a 5×10^6 células/mL y se añadió un volumen apropiado de CFSE (eBioscience, 65-0850-84) hasta una concentración final de 0.5 nM,
 30 mezclando bien inmediatamente para incubar durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, incorporando un volumen 4–5 veces el volumen de DMEM + 10% FBS para incubar sobre hielo y se incubó sobre hielo durante 5 minutos para terminar la reacción. Tras dos lavados con DMEM + 10% FBS preenfriado, la densidad celular se ajustó a 2×10^4 células/mL con medio DMEM + 10% medio FBS.

35 Co-incubación y detección: Las células positivas HEK293-hClaudin18.2 se digirieron

con una solución digestiva de enzima recombinante (TrypLETM Express Enzyme). Tras el recuento, se tomó una cantidad adecuada de suspensión celular, se centrifugó y se resuspendió en DMEM + 10% FBS. La densidad celular se ajustó a 2×10^4 células/mL. Las células HEK293 marcadas con CFSE y las células HEK293-hClaudin18.2 se mezclaron en volúmenes iguales y se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos a 100 μ L/pocillo, cultivándose durante la noche a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Al día siguiente, el fármaco ADC se diluyó con medio DMEM + 10% FBS hasta una concentración final de 0.5 nM, estableciéndose una concentración de muestra de 0 como control de blanco. Las muestras diluidas se añadieron a la placa de cultivo celular de 96 pocillos que contenían células a 100 μ L/pocillo y se incubaron durante 72 horas a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Se descartó el sobrenadante de la placa de cultivo celular de 96 pocillos, después las células se digirieron con una solución digestiva de enzima recombinante, se lavaron una vez con PBS con 1% FBS y se resuspendió cada muestra en 250 μ L de PBS con 1% FBS y conteo y cálculo del número total de células para cada muestra. Se tomaron 100 μ L de cada muestra para el análisis por FACS con el fin de determinar la proporción de células positivas y negativas para hClaudin18.2, y se calculó el número de células positivas y negativas en cada muestra en función del número total de células.

Conclusión: Después de que los fármacos ADC se cocultivaran respectivamente con células HEK293, HEK293-hClaudin18.2 y con el cultivo mixto HEK293 + HEK293-hClaudin18.2 durante 5 días, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo AlamarBlue. Los resultados se muestran en las Figs. 18A y 18B, donde la Fig. 18A corresponde al resultado del ensayo AlamarBlue y la Fig. 18B es el resultado del método de citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 18A, los cuatro fármacos ADC no presentan efecto citotóxico sobre las células negativas HEK293; en comparación con el ADC de control (IgG1 isotipo), tanto 9D1-LD-38 como 9D1-GGFG-Dxd muestran un efecto citotóxico sobre las células positivas HEK293-hClaudin18.2, siendo ambos efectos de eliminación, en comparación con el ADC de control (IgG1 isotipo), tanto 9D1-LD-38 como 9D1-GGFG-Dxd presentan efecto citotóxico sobre el cultivo mixto de células positivas y negativas, siendo el efecto citotóxico de 9D1-LD-38 más fuerte que el de 9D1-GGFG-Dxd. Estos resultados indican que 9D1-LD-38 tiene muerte de células espectadoras más potente que 9D1-GGFG-Dxd.

Tras el co-cultivo del fármaco ADC con células HEK293 de cultivo mezclado (marcadas con CFSE) + HEK293-hClaudin18.2 durante 3 días, se midió el número total de células y la proporción de células positivas a negativas mediante contadores celulares y citometría de flujo, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 18B, el ADC de control isotipo (Isotipo IgG1) no presenta efecto citotóxico ni sobre las células positivas HEK293-hClaudin18.2 ni sobre las células negativas HEK293, mientras que tanto 9D1-LD-38 como 9D1-GGFG-Dxd muestran efecto citotóxico sobre HEK293-hClaudin18.2 y células negativas HEK293, y el efecto citotóxico de 9D1-LD-38 sobre las células negativas HEK293 es mayor que el de 9D1-GGFG-Dxd. Los resultados anteriores indican que, 9D1-LD-38 tiene muerte de

células espectadoras más potente que 9D1-GGFG-Dxd.

Ejemplo experimental 26: Liberación enzimática *in vitro* de moléculas de toxina libre

5 Preparación de la solución tampón activada (10 mM L-cisteína (ACRO, Cat# 173600250), 15 mM EDTA, 0.1 M His-HCl, pH 5.5): se pesaron 3.63 g de cisteína sólida, se añadieron 3 mL de solución 0.1 M His-HCl (pH 5.5) para su disolución y, posteriormente, se añadieron 90 µL de solución 0.5 M de EDTA, mezclando bien.

Preparación de la muestra: 1) se tomaron 30 µL de la solución tampón activada, se
10 añadieron 5 µL de solución de la enzima catepsina B (0.15 mg/mL; Sino Biological, Cat# 10483-H08H), se mezcló bien y se colocó en un baño de agua a 37 °C durante 15 minutos; a continuación, se añadieron 300 µL de solución 0.1 M His HCl (pH 5.5) y 36 µL de 9D1-LD-38 (375 µg), manteniéndose en un baño de agua a 37 °C durante la noche para confirmar la liberación de la pequeña molécula libre digerida por la enzima. 2) LD-38, LD-65 y Deruxtecan (MC-GGFG-Dxd) se diluyeron por separado
15 a 14 mg/mL en DMSO; se tomaron 10 µL de cada uno de los enlazador-toxina diluidos, se añadieron 20 µL de solución tampón activada a cada uno y, posteriormente, se añadieron 250 µL (LD-38), 244.5 µL (LD-65) y 344.8 µL (MC-GGFG-Dxd) de solución tampón activada, respectivamente, mezclando bien y manteniéndolos en un baño de agua a 37 °C durante 15 minutos; se tomaron 2.3 µL de enzima catepsina B a 0.4 mg/mL (Sino Biological, Cat# 10483-H08H), se añadieron a 950 µL de solución
20 tampón activada y se mantuvieron en un baño de agua a 37 °C durante 15 minutos.; posteriormente, se tomaron 230 µL de la solución de enlazador-toxina activada y se añadieron 230 µL de la solución de enzima activada (la relación molar entre enlazador-toxina y catepsina B fue de aproximadamente 1200:1), incubándose en un baño de agua a 37 °C durante 0.5 h, 2 h, 4 h y 20 h. En cada punto de tiempo de detección, se tomaron 50 µL de la solución de digestión enzimática y se añadieron 2.5 µL
25 de solución de TFA al 10% para terminar la reacción, con el fin de detección de la cinética de la digestión enzimática. Los resultados se muestran en la Fig. 19.

Preparación del control negativo: se tomaron 30 µL de la solución tampón activada y se mantuvieron en un baño de agua a 37 °C durante 15 minutos; posteriormente, se añadieron 300 µL de solución 0.1 M His-HCl (pH 5.5) y 36 µL de 9D1-LD-38 (375 µg), manteniéndose en un baño de
30 agua a 37 °C durante la noche. Los parámetros de RP-HPLC (Proteomix RP-1000) se muestran en el Cuadro A.

CUADRO A

Inyección de volumen	20 μ L/5 μ L (preparación de muestra 1); 10 μ L (preparación de muestra 2)	Temperatura de columna		40°C (preparación de muestra 1) 60°C (preparación de muestra 2)
Temperatura de la sala de la muestra	10°C	Detección de longitud de onda		280/366 nm
Gradiente				
Tiempo (min)	Caudal (mL/min)	Fase Movil A (0.1%TFA)	Fase Movil B (0.1%TFA/ACN)	Curva
0	0.6	90%	10%	/
2.5	0.6	90%	10%	6
12.5 (preparación de muestra 1) / 17.5 (preparación de muestra 2)	0.6	50% (preparación de muestra 1) / 20% (preparación de muestra 2)	50% (preparación de muestra 1) / 80% (preparación de muestra 2)	6
15 (preparación de muestra 1) / 20 (preparación de muestra 2)	0.6	5%	95%	1
20 (preparación de muestra 1) / 25 (preparación de muestra 2)	0.6	90%	10%	1

Conclusión: Como puede observarse a partir de la Figura 19, las moléculas de toxina liberadas a partir de 9D1-LD-38 tras la escisión por la enzima catepsina B es consistente con el tiempo pico del Exatecan estándar, y no se observa ningún pico de interferencia en el grupo control (Control) sin adición de la enzima catepsina B. Por lo tanto, puede determinarse que la catepsina B es capaz de escindir eficazmente el enlazador de 9D1-LD-38, y que el producto liberado tras la escisión corresponde a Exatecan libre.

Las cinéticas de escisión enzimática de LD-38, LD-65 y Deruxtecan (MC-GGFG-Dxd) se muestran en el Cuadro 9. LD-38 puede liberar eficazmente las moléculas de toxina tras la escisión por la enzima catepsina B, alcanzándose una escisión casi completa (95 %) después de 4 horas. En cambio, LD-65 y MC-GGFG-Dxd no son sensibles a la enzima catepsina B; después de 20 horas de digestión enzimática, LD-65 únicamente libera una cantidad mínima de toxina (4 %), mientras que MC-GGFG-Dxd no libera ningún producto de digestión enzimática.

Cuadro 9: Cinética de digestión por la enzima cathepsina B de LD-38, LD-65 y Deruxtecan (MC-GGFG-Dxd).

Tiempo (h) Enlazador	0	1h	2h	4h	20h
LD-38	0%	20%	77%	95%	100%
LD-65	0%	0%	1%	1%	4%
Deruxtecan (MC-GGFG-Dxd)	0%	0%	0%	0%	0%

Ejemplo Experimental 27: Estabilidad de suero *in vitro*

5 Incubación de muestras: Los conjugados 9D1-LD-38, 9D1-LD-65, 9D1-LD-73, 9D1-LD-74 y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) (cada uno con un valor DAR de 8, respectivamente), preparados a partir de los Ejemplos Experimentales antes mencionados, se prepararon respectivamente con suero humano, de mono cynomolgus y de rata (adicionalmente, se empleó suero de ratón para la preparación de 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65) respectivamente, obteniéndose una
10 concentración final de 300 µg/mL, con 200 µL por tubo, tres pocillos duplicados, y estableciéndose un control negativo (0.5 % BSA-PBS) y un estándar. Todas las muestras se incubaron en un incubador a 37 °C durante 0, 1 día, 3 días, 7 días, 14 días y 21 días, tras lo cual se determinó la cantidad de toxina libre Exatecan.

Procesamiento de muestras: se tomaron 10.0 µL de la muestra de curva estándar, muestra de control de calidad, muestra de ensayo, muestra doble blanco (10.0 µL de muestra de matriz) y muestra de concentración cero (10.0 µL de muestra de matriz), respectivamente, y se añadieron a tubos tipo tira, luego, se añadieron 25.0 µL de la solución de trabajo del estándar interno (la concentración de Exatecan-D5 de 3.00 ng/mL; las muestras doble blanco se añadieron 25.0 µL del diluyente del estándar interno); se añadieron 90.0 µL de una mezcla de metanol y acetonitrilo (1:1, v/v) a cada pocillo, agitándose a 2500 rpm durante 5 minutos, y se centrifugó a 4 °C y 3800 g durante 5 minutos. Se tomaron 80.0 µL del sobrenadante y se secaron con nitrógeno a 40 °C; se añadieron 100 µL de 0.1 % de FA en 15 % de MeOH a cada pocillo para mezclar completamente y se analizó mediante inyección en LC-MS.

25 Análisis de muestras: bajo condiciones de cromatografía líquida (Nexera, Shimadzu), fase móvil A: solución acuosa de ácido fórmico al 0.1 %; fase móvil B; solución de acetonitrilo al 0.1 %. Columna cromatográfica, ACE Excel 3 µm 300 Å, 50 × 2.1 mm; el caudal fue de 0.6 mL/min; temperatura de la columna: 40 °C; análisis por espectrometría de masas (Triple Quad 7500 AB/Science); adquisición de datos

(Analyst, versión 1.6.2 (Applied Biosystems/Sciex).

Procesamiento de datos: el contenido de toxina en el ADC se calculó conforme a la fórmula: $C_{\text{toxina}} = (\text{peso molecular de la toxina} * \text{DAR}) / \text{peso molecular del ADC} * 300 \mu\text{g/mL}$, y la tasa de liberación de toxina en suero = contenido de toxina en suero / C_{toxina} . Las curvas se representaron utilizando GraphPad Prism 9, tomando el tiempo de incubación como eje x y la tasa de liberación como eje y.

Conclusión: en el estudio de estabilidad sérica in vitro, las curvas que muestran la variación de la tasa de liberación de la toxina Exatecan en función del tiempo se presentan en las Figs. 20A a 20F. La liberación de toxina de los ADC aumenta con la prolongación del tiempo de incubación. Las tasas de liberación de toxina de 9D1-LD-38 (Fig. 20A) en suero humano, de mono cynomolgus y de rata, tras incubación a 37 °C durante 21 días, son únicamente 2.8 %, 0.9 % y 3.3 %, respectivamente (observándose el pico de liberación en suero de rata aproximadamente a los 7 días de incubación). Las tasas de liberación de Dxd de 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) (Figura 20B) tras 21 días de incubación bajo las mismas condiciones son 8.5 % (suero humano), 4.6 % (suero de mono cynomolgus) y 5.3 % (suero de rata), respectivamente, lo que equivale aproximadamente a 3 veces, 5 veces y 1.5 veces las tasas de liberación de toxina de 9D1-LD-38 en los sueros de las especies correspondientes. La estabilidad de 9D1-LD-65 (Fig. 20C), 9D1-LD-73 (Fig. 20D) y 9D1-LD-74 (Fig. 20E) en suero humano, de mono cynomolgus y de rata es similar a la de 9D1-LD-38. La tasa máxima de liberación en suero humano de aproximadamente 3 %, y la tasa máxima de liberación de toxina en suero de mono cynomolgus y de rata es inferior al 1.5 %. La liberación de toxina de 9D1-LD-38 en suero de ratón es ligeramente superior a la de 9D1-LD-65 (Figura 20F), si bien la diferencia no resulta significativa, y las tasas máximas de liberación de ambos no superan el 2 % tras 21 días.

Ejemplo experimental 28: Cambios dinámicos de los valores DAR de ADC en ratas

Se seleccionaron tres ratas macho SD y se dividieron aleatoriamente en tres grupos. Las muestras de ensayo (es decir, 9D1-LD-38, 9D1-LD-65 y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) preparadas en los Ejemplos Experimentales previos, cada una con un valor DAR de 8) se administraron por vía intravenosa en una sola dosis de 10 mg/kg. Se recolectó sangre total de los animales de cada grupo de ensayo antes de la administración, y a los 5 minutos, 1 hora, 5 horas, 24 horas (D2), 48 horas (D3), 120 horas (D6), 168 horas (D8), 240 horas (D11), 336 horas (D15) y 504 horas (D22) después de la administración; y el suero y el plasma se recolectaron por separado y se almacenaron a -60 °C.

Método para la detección del anticuerpo total en suero: se tomaron respectivamente 10.0 µL de la muestra de la curva estándar, muestra de control de calidad, muestra de ensayo, muestra

doble blanco (10.0 µL de muestra de matriz) y muestra de concentración cero (10.0 µL de muestra de matriz), y se añadieron a tubos de tira; se añadieron 100 µL de precipitante (solución de isopropanol con 1% de ácido tricloroacético) a cada tubo para agitar a 2000 rpm durante 5 minutos y se centrifugó a 10 °C y 500 g durante 5 minutos; luego se retiró el sobrenadante; se añadieron 100 µL de solución de bicarbonato de amonio (100 mM, pH = 8.0) a cada tubo para vórtex y mezclar bien para resuspender el precipitado, se centrifugó a 10 °C y 1000 g durante 5 minutos, luego se retiró el sobrenadante; se añadieron 50.0 µL de solución de bicarbonato de amonio (100 mM, pH = 8.0) a cada tubo y se llevó a vórtex para mezclar bien; se añadieron 10.0 µL de solución de tripsina Sigma (Sigma, cat# Y0002311) (5 mg/mL) a cada tubo, se centrifugó a 3500 rpm durante 30 segundos, se vortexó a 1000 rpm durante 3 minutos y luego se incubó durante 1.5 horas en una incubadora con agitación a 60 °C y 550 rpm. Tras la incubación, se añadieron 20.0 µL de FA al 10% en ACN (agente de terminación) a cada tubo. A la muestra de concentración cero, la muestra de la curva estándar, la muestra de control de calidad y la muestra de ensayo se añadieron respectivamente 10.0 µL de la solución de trabajo del estándar interno (TTPP-IS, segmento peptídico universal Fc humano, 5000 ng/mL). A la muestra doble blanco se añadieron 10.0 µL del disolvente de preparación del estándar interno (solución de bicarbonato de amonio (100 mM, pH = 8.0)). Las muestras anteriores se centrifugaron a 3800 g durante 10 segundos y se vortexaron a 1200 rpm durante 2 minutos; luego se centrifugaron a 3800 g durante 5 minutos, se tomaron 50.0 µL del sobrenadante, se añadieron 50.0 µL de agua a cada tubo para mezclar bien y se analizaron mediante inyección en LC-MS.

Método para la detección de la toxina conjugada en suero: se tomaron respectivamente 10.0 µL de la muestra de la curva estándar, muestra de control de calidad, muestra de ensayo, muestra doble blanco (10.0 µL de muestra de matriz) y muestra de concentración cero (10.0 µL de muestra de matriz), y se añadieron a tubos de tira, a cada tubo se añadieron 90 µL de precipitante (solución de isopropanol con 1% de ácido tricloroacético), se agitó a 2000 rpm durante 5 minutos y se centrifugó a 10 °C y 500 g durante 5 minutos; luego se retiró el sobrenadante; se añadieron 60 µL de solución de bicarbonato de amonio (100 mM, pH = 6.0) a cada tubo, se vortexó para resuspender el precipitado, se centrifugó a 10 °C y 1000 g durante 5 minutos, luego se retiró el sobrenadante; se añadieron 60.0 µL de solución de bicarbonato de amonio (100 mM, pH = 8.0) a cada tubo y se vortexó para mezclar bien; se añadieron 60.0 µL de papaína (Adamas Life, cat# 88915D, 5 mg/mL) a cada tubo, se centrifugó a 3500 rpm durante 30 segundos, se vortexó a 1000 rpm durante 3 minutos y luego se incubó durante 2 horas en una incubadora con agitación a 40 °C y 550 rpm. Tras la incubación, se añadieron 20.0 µL de FA al 10% en ACN (agente de terminación) a cada tubo. A la muestra de concentración cero, la muestra de la curva estándar, la muestra de control de calidad y la muestra de ensayo se añadieron respectivamente 10.0 µL de la solución de trabajo del estándar interno (TTPP-IS, segmento peptídico universal Fc humano, 5000 ng/mL). A la muestra doble blanco se

añadieron 10.0 µL del disolvente de preparación del estándar interno (solución de bicarbonato de amonio (100 mM, pH = 8.0)). Las muestras anteriores se centrifugaron a 3800 g durante 10 segundos y se vortexaron a 1200 rpm durante 2 minutos; luego se centrifugaron a 3800 g durante 5 minutos, se tomaron 50.0 µL del sobrenadante, se añadieron 50.0 µL de agua a cada tubo para mezclar bien y se analizaron mediante inyección en LC-MS.

Se utilizó el método LC/MS para determinar las concentraciones de anticuerpo total (Ab) y de toxina conjugada de cada muestra de ensayo en las muestras de suero. Los valores DAR del anticuerpo conjugado en los distintos puntos temporales para cada animal se calcularon mediante la siguiente fórmula: $\text{DAR} = \text{concentración de la toxina conjugada (mmol/L)} / \text{concentración del anticuerpo total (mmol/L)}$.

Conclusión: las curvas de los valores DAR del ADC en función del tiempo en el suero de los animales de cada grupo de muestras de ensayo se muestran en la Fig. 21. En condiciones de una sola inyección intravenosa en ratas a una dosis de 10 mg/kg, los valores DAR de 9D1-LD-38, 9D1-LD-65 y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) disminuyen gradualmente con el tiempo. Las curvas de valores DAR de 9D1-LD-65 y 9D1-LD-38 son casi consistentes y pueden mantenerse en un nivel elevado de DAR. A las 48 horas después de la administración, el valor DAR se mantiene alrededor de 7, y para el día 21 permanece alrededor de 3–4. Los valores DAR de 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) muestran una tendencia de disminución rápida. A las 48 horas después de la administración, el valor DAR desciende desde aproximadamente 7.5 en la etapa inicial de administración hasta 5.5, y para el día 21 desciende hasta alrededor de 1.6. Los resultados anteriores indican que, tras la administración in vivo, en comparación con 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd), 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65 son más estables y presentan valores DAR más altos.

Ejemplo experimental 29: Distribución tisular in vivo en ratones portadores de tumor

Modelado y administración en ratones portadores de tumor: ratones macho C57BL/6 (6 semanas de edad) fueron inoculados por vía subcutánea con células MC38-hClaudin18.2 (1×10^6 células en 100 µL de PBS) en la región ventral. Cuando el volumen tumoral de los ratones alcanzó aproximadamente 300 mm³, los ratones se dividieron en grupos y se les administró, mediante inyección en la vena caudal, 9D1-LD-38, 9D1-LD-65, 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) preparados en los Ejemplos Experimentales previos y PBS, cada uno tenía un valor DAR de 8 y una dosis de 10 mg/kg.

Recolección de muestras: se recolectaron sangre y tejido tumoral a las 24 horas, 72 horas y 168 horas después de la administración, muestreándose 3 ratones en cada punto temporal. La sangre total se recolectó de la órbita de los ratones portadores de tumor y se colocó en tubos con anticoagulante EDTA-K2, centrifugándose dentro de los 30 minutos para obtener plasma. Los ratones fueron eutanasiados mediante el método de asfixia con CO₂ y posteriormente se recolectaron los

tumores. El plasma y los tejidos tumorales se almacenaron a -80°C .

Determinación de toxinas libres en plasma: se tomaron respectivamente 10.0 μL de la muestra de la curva estándar, muestra de control de calidad, muestra de ensayo, muestra doble blanco (10.0 μL de muestra de matriz) y muestra de concentración cero (10.0 μL de muestra de matriz), y se
 5 añadieron a tubos de tira; se añadieron 25.0 μL de la solución de trabajo del estándar interno (la concentración de Exatecan-D5 fue de 3.00 ng/mL; y se añadieron a la muestra doble blanco 25.0 μL del diluyente del estándar interno); se añadieron 90.0 μL de una mezcla de metanol y acetonitrilo (1:1, v/v) a cada tubo y se agitó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se centrifugó a 4°C y 3800 g durante 5 minutos. Se tomaron 80.0 μL del sobrenadante y se secaron con nitrógeno a 40°C ; luego se añadieron
 10 100 μL de FA al 0.1% en 15% MeOH a cada tubo, se mezcló bien y se analizó mediante inyección en LC-MS.

Determinación de toxinas totales en sangre (toxina conjugada + toxina libre): se tomaron respectivamente 10.0 μL de la muestra de la curva estándar, muestra de control de calidad, muestra de ensayo, muestra doble blanco (10.0 μL de muestra de matriz) y muestra de concentración
 15 cero (10.0 μL de muestra de matriz), y se añadieron a tubos de tira; se añadieron 10.0 μL de papaína (Adamas Life, cat# 88915D, 5 mg/mL) a cada tubo y se centrifugó a 3500 rpm durante 1 minuto; las muestras se incubaron durante 6–8 horas en una incubadora con agitación a 40°C y 550 rpm. Posteriormente, se añadió 1.00 μL de FA al 1% en H_2O a cada tubo, se centrifugó a 3500 rpm durante 1 minuto y se incubó nuevamente a 40°C y 550 rpm durante otros 30 minutos. A la muestra de
 20 concentración cero, la muestra de la curva estándar, la muestra de control de calidad y la muestra de ensayo se añadieron 10.0 μL de la solución de trabajo del estándar interno (Exatecan-D5, 1000 ng/mL); y a la muestra doble blanco se añadieron 10.0 μL del disolvente de preparación del estándar interno. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3800 g durante 10 segundos y se vortexaron a 1200 rpm durante 2 minutos. Se añadieron 100 μL de ACN preenfriado a cada tubo, se agitó a 2500
 25 rpm durante 5 minutos y se centrifugó a 3500 g durante 5 minutos. Se tomaron 30.0 μL del sobrenadante, se añadieron 90.0 μL de FA al 0.5% en H_2O a cada tubo, se vortexó durante 3 minutos y se analizó mediante inyección en LC-MS.

Determinación de toxina libre en tejido tumoral: tratamiento de homogeneización del tejido tumoral (grupo de administración y grupo blanco PBS): el tejido tumoral se pesó y se añadió un
 30 volumen diez veces mayor de solución acuosa de metanol al 50% para realizar la homogeneización. La homogeneización del grupo blanco PBS se utilizó como matriz para preparar la curva estándar y las muestras de control de calidad. Se tomaron respectivamente 10.0 μL de la muestra de la curva estándar, muestra de control de calidad, muestra de ensayo, muestra doble blanco (10.0 μL de muestra de matriz) y muestra de concentración cero (10.0 μL de muestra de matriz), y se añadieron
 35 a tubos de tira. Luego se añadieron 25.0 μL de la solución de trabajo del estándar interno (la

concentración de Exatecan-D5 fue de 3.00 ng/mL; a la muestra doble blanco se añadieron 25.0 µL del diluyente del estándar interno). Posteriormente, se añadieron 90.0 µL de una mezcla de metanol y acetonitrilo (1:1, v/v) a cada tubo y se agitó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se centrifugó a 4 °C y 3800 g durante 5 minutos. Se tomaron 80.0 µL del sobrenadante y se secaron con nitrógeno a 40 °C.

- 5 A continuación, se añadieron 100 µL de FA al 0.1% en 15% MeOH a cada tubo, se vortexó durante 3 minutos y se analizó mediante inyección en LC-MS.

- Determinación de toxinas totales (toxina conjugada + toxina libre) en tejido tumoral: se tomaron respectivamente 10.0 µL de la muestra de la curva estándar, muestra de control de calidad, muestra de ensayo, muestra doble blanco (10.0 µL de muestra de matriz) y muestra de concentración
10 cero (10.0 µL de muestra de matriz), y se añadieron a tubos de tira. Se añadieron 10.0 µL de papaína (Adamas Life, cat# 88915D, 5 mg/mL) a cada tubo y se centrifugó a 3500 rpm durante 1 minuto; posteriormente, se incubó durante 6 a 8 horas en una incubadora con agitación a 40 °C y 550 rpm. Luego se añadieron 1.00 µL de FA al 1% en H₂O a cada tubo, se centrifugó a 3500 rpm durante 1
15 minuto y se incubó nuevamente durante otros 30 minutos a 40 °C y 550 rpm. A la muestra de concentración cero, la muestra de la curva estándar, la muestra de control de calidad y la muestra de ensayo se añadieron 10.0 µL de la solución de trabajo del estándar interno (Exatecan-D5, 1000 ng/mL). A la muestra doble blanco se añadieron 10.0 µL del disolvente de preparación del estándar interno. Posteriormente, las muestras anteriores se centrifugaron a 3800 g durante 10 segundos y se vortexaron a 1200 rpm durante 2 minutos. Se añadieron 100 µL de ACN preenfriado a cada tubo, se
20 agitó a 2500 rpm durante 5 minutos y se centrifugó a 3500 g durante 5 minutos. Se tomaron 30.0 µL del sobrenadante, se añadieron 90.0 µL de FA al 0.5% en H₂O a cada tubo, se vortexó durante 3 minutos y se analizó mediante inyección en LC-MS.

- Análisis de muestras: bajo condiciones de cromatografía líquida (Nexera, Shimadzu), la fase móvil A fue una solución acuosa de ácido fórmico al 0.1%, y la fase móvil B fue una solución
25 de acetonitrilo al 0.1%. La columna cromatográfica fue ACE Excel 3 µm, 300 Å, 50 × 2.1 mm; caudal: 0.6 mL/min; temperatura de la columna: 40 °C. El análisis por espectrometría de masas se realizó (Triple Quad 7500 AB/Science); la adquisición de datos se llevó a cabo con Analyst, versión 1.6.2 (Applied Biosystems/Sciex). El software GraphPad Prism 9 se utilizó para introducir los puntos temporales de recolección de muestras y los contenidos correspondientes de toxinas, con el fin de
30 trazar las curvas de contenido de toxinas en plasma y tejido tumoral. Los resultados se muestran en las Figs. 22A a 23B; donde la Fig. 22A muestra la toxina total (toxina conjugada + toxina libre) en el plasma de ratones portadores de tumor, y la Fig. 22B muestra el contenido de toxinas libres en el plasma de ratones portadores de tumor, donde la Fig. 23A muestra las toxinas totales (toxina conjugada + toxina libre) en los tejidos de ratones portadores de tumor, y la Fig. 23B muestra el
35 contenido de toxina libre en los tejidos de ratones portadores de tumor.

Conclusión: como se observa en las Figs. 22A y 22B, la tendencia de los cambios de toxinas libres y totales en el plasma de los animales de cada grupo de ensayo es básicamente consistente, alcanzando el valor máximo a las 24 horas y disminuyendo lentamente posteriormente. Los contenidos totales de toxinas (Fig. 22A) de los grupos 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65 son prácticamente iguales, con un contenido de 3000–4000 ng/mL a las 24 horas y una disminución de aproximadamente 70%–80% después de 7 días. El contenido total de toxinas en el plasma de 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) en cada punto temporal es solo alrededor de la mitad (1/2) del de 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65. Los contenidos y las tendencias de cambio de las toxinas libres en el plasma de los animales de los grupos 9D1-LD-38, 9D1-LD-65 y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) también son básicamente consistentes (Fig. 22B), con el nivel más alto a las 24 horas y una disminución lenta posterior. En comparación con los contenidos totales de toxinas en plasma, los contenidos de toxinas libres son extremadamente bajos; sus concentraciones a las 24 horas son inferiores a 0.4 ng/mL, representando el 0.01%–0.02% del contenido total de toxinas, y son mucho menores que el valor de IC_{50} para la eliminación in vitro de células blanco (3 ng/mL). Esto indica que las toxinas de los tres fármacos ADC tienen menor tendencia a desprenderse en el plasma y son relativamente estables.

Como se observa en las Figs. 23A y 23B, a las 24 horas después de la administración, el nivel de toxina total en los tejidos tumorales de cada grupo de tratamiento es el más alto (Fig. 23A), y después de 168 horas disminuye rápidamente hasta aproximadamente 1/3 del contenido a las 24 horas. En particular, los niveles de enriquecimiento de 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65 en los tejidos tumorales son significativamente mayores que los de 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd). A las 24 horas después de la administración, el nivel de toxina libre en los tejidos tumorales de cada grupo de tratamiento es el más alto (Fig. 23B), disminuyendo gradualmente a partir de las 72 horas y manteniéndose hasta las 168 horas. Los niveles de toxinas libres en los tejidos tumorales de 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65 son significativamente superiores a los de 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) (2–5 veces) durante todo el período, siendo el de 9D1-LD-38 el óptimo. Los resultados anteriores sobre el contenido de toxina total (toxina conjugada + toxina libre) y de toxina libre en los tejidos tumorales de los ratones portadores de tumor indican que 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65 presentan un mejor enriquecimiento osmótico en el tejido tumoral y mayores niveles de liberación de toxinas libres. Por lo tanto, en comparación con 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd), 9D1-LD-38 y 9D1-LD-65 pueden producir mejores efectos terapéuticos antitumorales.

Ejemplo experimental 30: Farmacodinámica de un modelo de ratón portador de tumor resistente a fármacos mediado por p-gp

Modelado y administración de ratones portadores de tumor: Ratones BALB/c Nude (hembras, de 5–6 semanas de edad) fueron inoculados por vía subcutánea con células MC38-

hClaudin18.2 (1×10^6 células en 100 μL de PBS) en la región ventral. Cuando el volumen tumoral aumentó hasta aproximadamente 120 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos y se administraron los tratamientos de acuerdo con la Tabla 10. El tumor y el peso corporal se midieron dos veces por semana para calcular los volúmenes tumorales (TV, mm^3) y trazar las curvas de crecimiento tumoral. TV (mm^3) = $(L \times W^2) / 2$, donde L representa la longitud del tumor y W representa el ancho del tumor. Se utilizó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California) en modo XY para trazar las curvas de crecimiento tumoral y las curvas de peso corporal de los ratones, y los volúmenes tumorales y los pesos se expresaron como media $\pm$ error estándar. Los resultados se muestran en las Figs. 24A y 24B, donde la Fig. 24A muestra las curvas de crecimiento tumoral en ratones y la Fig. 24B muestra las curvas de peso corporal de los ratones.

Cuadro 10: Agrupación y esquema de administración del modelo de ratón portador de tumor resistente a fármacos mediado por p-gp

Grupos	Número de animales	Fármacos administrados	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Período de administración
1	5	9D1-LD-38	10	i.p.	QW×2 dosis
2	5	9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd)	10	i.p.	QW×2 dosis
3	5	Tariquidar	10	p.o.	QD×10 dosis (5activo+2inactivo/ciclo,×2)
4	5	9D1-VC-MMAE	10+15	i.p.	QW×2 dosis
5	5	9D1-LD-38 + Tariquidar	10+15	i.p.+p.o.	QW×2 dosis + QD×10 dosis (5activo+2inactivo/ciclo,×2)
6	5	9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) + Tariquidar	10+15	i.p.+ p.o.	QW×2 dosis + QD×10 dosis (5activo+2inactivo/ciclo,×2)
7	5	9D1-vc-PAB-MMAE+ Tariquidar	10+15	i.p.+ p.o.	QW×2 dosis + QD×10 dosis (5activo+2inactivo/ciclo,×2)
8	5	PBS	--	i.p.+ p.o.	QW×2 dosis + QD×10 dosis (5activo+2inactivo/ciclo,×2)

Nota: i.p., inyección intraperitoneal, administración intraperitoneal; p.o., Peros, administración oral; QW, una vez por semana; QD, una vez al día; 5activo+2inactivo/ciclo; 7 días como un período, 5 días de administración y 2 días de descanso; 9D1-LD-38 y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd), DAR = 8; 9D1-vd-PAB-MMAE, DAR = 4; Tariquidar: inhibidor de p-gp (cat# HY-10550/CS-0722; lote: 242595).

Conclusión: la glicoproteína P (P-gp), una proteína transportadora transmembrana, conduce a la resistencia a la quimioterapia mediante la expulsión activa de los fármacos, lo que

constituye una de las principales causas del fracaso del tratamiento quimioterapéutico. El modelo murino de cáncer rectal MC38 presenta una alta expresión de p-gp y es insensible a numerosos fármacos quimioterapéuticos. El efecto terapéutico antitumoral del tratamiento con ADC en monoterapia o en combinación con el inhibidor de p-gp Tariquidar en el modelo de ratón portador de tumor MC38-hClaudin18.2 se muestra en la Fig. 24A. La monoterapia con Tariquidar no presenta efecto inhibidor tumoral en comparación con el grupo control PBS; el crecimiento tumoral en el grupo 9D1-vc-PAB-MMAE fue rápido y la curva de crecimiento tumoral muestra un efecto inhibidor débil en comparación con el grupo control PBS (los volúmenes tumorales son aproximadamente 2600 mm³ y 1900 mm³ al día 17 tras la administración, respectivamente). La combinación de 9D1-vc-PAB-MMAE y Tariquidar puede inhibir en gran medida el crecimiento tumoral, provocando una reducción del tumor hasta casi su desaparición; y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral. El efecto inhibidor tumoral de 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) + Tariquidar se ve ligeramente potenciado en comparación con la monoterapia con 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd), pero ninguno de los dos provoca la reducción del tumor (los volúmenes tumorales son aproximadamente 1000 mm³ y 660 mm³ al día 17 tras la administración, respectivamente). Tanto la monoterapia 9D1-LD-38 como la combinación 9D1-LD-38 + Tariquidar pueden inhibir de manera potente el crecimiento tumoral y provocar una reducción del tumor hasta casi su desaparición. El peso corporal de los ratones se mantiene dentro del rango normal de fluctuación tras la administración, y no se observó pérdida de peso inducida por el tratamiento (Fig. 24B). Los resultados anteriores indican que, en comparación con 9D1-vc-PAB-MMAE y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd), 9D1-LD-38 puede superar la resistencia a fármacos en tumores causada por p-gp, y la administración del fármaco en monoterapia puede producir buenos efectos terapéuticos antitumorales.

Ejemplo experimental 31: Efecto antitumoral de la administración combinada con ICI en ratones portadores de tumor

Modelado y administración de ratones portadores de tumor: las células 4T1-hClaudin18.2 se cultivaron en medio completo 1640 (suplementado con 10% de FBS y 2 µg/mL de puromicina; Gibco, cat# A1113803) para cultivo adherente en frascos cuadrados a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Cuando la confluencia celular alcanzó aproximadamente el 80%, las células se digirieron con tripsina TRYPLE EXPRESS (Gibco, cat# 12605028) y posteriormente se recolectaron 2.5×10^7 células por centrifugación, lavándose una vez con PBS. Tras descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS que contenía 50% de Matrigel (Corning, cat# 326234), con un volumen total de 5 mL. Las células se inocularon en la piel del lado derecho del abdomen de ratones BALB/c hembra (5–6 semanas de edad) a razón de 100 µL de suspensión celular

por ratón. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen de aproximadamente 150 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos para su administración de acuerdo con la Tabla 11. El tamaño de los tumores se midió dos veces por semana con un calibrador vernier. $TV \text{ (mm}^3\text{)} = (L \times W^2) / 2$, donde L representa la longitud del tumor y W representa el ancho del tumor. Se utilizó el software

5 GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California) en modo XY para trazar las curvas de crecimiento tumoral en ratones, y los volúmenes tumorales se expresaron como media $\pm$ error estándar.

CUADRO 11: Agrupación y esquema de administración de la administración combinada con ICI en el modelo de ratón portador de tumor.

Grupos	Número de animales	Fármaco	Dosis de administración (mg/kg)	Vía de administración	Frecuencia de administración	Tiempo de administración
G1	5	9D1-LD-38	3	i.p.	QW	2
G2	5	α PD-1	10	i.p.	BIW	4
G3	5	9D1-LD-38+ α PD-1	3+10	i.p.	QW+BIW	2+4
G4	5	PBS	-	i.p.	QW	2

Nota: i.p., inyección intraperitoneal, administración intraperitoneal; QW, administración una vez por semana; BIW, administración dos veces por semana; α PD-1: anticuerpo anti-PD-1 de ratón (InVivoMAb, cat# BE0146).

15

Conclusión: los fármacos inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) se han convertido en uno de los pilares del tratamiento antitumoral. El efecto terapéutico combinado de 9D1-LD-38 con el fármaco anti-PD-1 de ratón (α PD-1) en un modelo de ratón portador de tumor 4T1-hClaudin18.2 en ratones BALB/c inmunocompetentes se muestra en la Fig. 25. En comparación con el

20 grupo control PBS, tanto la monoterapia con 9D1-LD-38 como la monoterapia con α PD-1 producen una inhibición parcial del crecimiento tumoral (los volúmenes tumorales al día 14 tras la administración son aproximadamente 850 mm³, 480 mm³ y 426 mm³, respectivamente). La administración combinada de 9D1-LD-38 + α PD-1 puede inhibir de manera significativa el crecimiento tumoral e incluso producir una regresión tumoral notable (el volumen tumoral al día 10 tras la administración es

25 de aproximadamente 70 mm³).

Ejemplo experimental 32: Efecto antitumoral de muerte de células espectadoras en ratones portadores de tumor

Modelado y administración de ratones portadores de tumor: las células MC38-hClaudin18.2 y las células MC38-luc (luciferasa) se cultivaron respectivamente en medio DMEM que contenía 10% de suero fetal bovino inactivado (Excel Bio, cat# 12A222) y 1× penicilina/estreptomicina (Solarbio, cat# 20221231), a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Las células tumorales en fase de crecimiento logarítmico se utilizaron para la inoculación tumoral in vivo. Las células MC38-hClaudin18.2 se mezclaron con las células MC38-luc (en una proporción de 1:1), se resuspendieron en PBS, se ajustó la concentración celular a 5×10^6 /mL y se inocularon por vía subcutánea en el lado derecho del abdomen de ratones BALB/c node a razón de 100 µL por ratón. Cuando los tumores crecieron hasta aproximadamente 120 mm³, los ratones se dividieron en 4 grupos y se administraron los tratamientos (el primer día de administración se registró como PG-D0), con 5 ratones en cada grupo. Los regímenes específicos de administración se muestran en el Cuadro siguiente.

Cuadro 12: Agrupación y régimen de muerte de células espectadoras en el modelo de ratón portador de tumor.

Grupos	Número de animales	Tratamientos	Dosis (mg/kg)*	Vía de administración	Frecuencia de administración
G1	5	9D1-LD-38	10	i.v.	QW×2
G2	5	ISO-LD-38	10	i.v.	QW×2
G3	5	9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd)	10	i.v.	QW×2
G4	5	Control (PBS)	-	i.v.	QW×2

Nota*: el volumen de administración es de 10 µL/g de peso corporal;

i.v., inyección intravenosa; QW × 2, administración una vez por semana, para un total de 2 administraciones.

Los volúmenes tumorales se midieron 2 a 3 veces por semana con un calibrador vernier, midiendo el diámetro largo y el diámetro corto del tumor. La fórmula para calcular el volumen fue: volumen (TV) = $0.5 \times \text{diámetro largo} \times \text{diámetro corto} \times \text{diámetro corto}$. Mediante inyección intraperitoneal del sustrato de fluoresceína (15 mg/mL, 10 µL/g) en los ratones, y bajo anestesia con isoflurano, las señales de bioluminiscencia se recolectaron utilizando un sistema de formación de

imagen in vivo para pequeños animales (IVIS Lumina Series III, PerkinElmer).

Conclusión: la muerte de células espectadoras es la capacidad de los fármacos ADC de liberar toxinas después de ser internalizados por células tumorales objetivo positivas, mediante lo cual dichas toxinas pueden matar células tumorales diana negativas adyacentes a través de la acción transmembrana. La muerte de células espectadoras se considera una de las razones por las que los ADC pueden producir buenos efectos terapéuticos contra tumores con expresión heterogénea del objetivo. En este Ejemplo Experimental se generó un modelo de ratón portador de tumor con expresión heterogénea del antígeno mediante la coinoculación de células objetivo positivas (MC38-hClaudin18.2) y células objetivo negativas (MC38-luc) en ratones, y se validó la muerte de células espectadoras de los ADC en estudio. Los resultados se muestran en las Figs. 26A y 26B. La Fig. 26A muestra los cambios en los volúmenes tumorales de los ratones tras la administración, y la Fig. 26B muestra la señal de bioluminiscencia de las células tumorales objetivo negativas en ratones portadores de tumor en el día 3 y el día 7 después de la administración. Como se observa en la Fig. 26A, en comparación con el grupo control PBS (Control), el grupo ISO (Isotipo)-LD-38 presenta un crecimiento tumoral más rápido y solo muestra un efecto inhibidor tumoral débil (en el día 16 tras la inoculación tumoral, los volúmenes tumorales son de aproximadamente 2700 mm³ y 1700 mm³, respectivamente). 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd) puede inhibir parcialmente el crecimiento tumoral (en el día 16 tras la inoculación tumoral, el volumen tumoral fue de aproximadamente 1000 mm³), pero el volumen tumoral continúa aumentando. 9D1-LD-38 puede inhibir en gran medida el crecimiento tumoral y, en el día 16, el tumor está casi completamente eliminado, lo que indica que 9D1-LD-38 no solo puede matar las células MC38-hClaudin18.2 objetivo positivas, sino también las células MC38-luc objetivo negativas. Las señales de bioluminiscencia (Fig. 26B) de las células tumorales objetivo negativas en ratones portadores de tumor recolectadas en el día 3 (PG-3, tercer día tras la inoculación) y en el día 7 (PG-7, duodécimo día tras la inoculación) después de la agrupación muestran claramente que, en comparación con el grupo control y con los grupos de tratamiento ISO-LD-38 y 9D1-Deruxtecan (9D1-GGFG-Dxd), 9D1-LD-38 es capaz de eliminar eficazmente las células tumorales objetivo negativas y provocar una reducción significativa o incluso la desaparición de las señales de bioluminiscencia.

Aunque las modalidades de la presente solicitud se han descrito junto con los dibujos adjuntos, la presente solicitud no se limita a las modalidades y campos de aplicación específicos anteriores. Las modalidades específicas anteriores son sólo ilustrativas y orientativas, y no restrictivas. Inspirándose en esta especificación y sin apartarse del alcance de las reivindicaciones de esta solicitud, un experto en la técnica también puede realizar muchas variantes, todas las cuales caen dentro del alcance de protección de esta solicitud.