



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 877 409**

⑮ Int. Cl.:

A61K 47/55 (2007.01)
A61K 47/64 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2016 PCT/CN2016/094704**
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025057**
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16834681 (5)**
⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3334500**

⑮ Título: **Conjugados farmacológicos multiligandos y usos de los mismos**

⑩ Prioridad:

11.08.2015 CN 201510489556
11.08.2015 CN 201510489560

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2021

⑮ Titular/es:

COHERENT BIOPHARMA I, LIMITED (100.0%)
Unit 417, 4/F., Lippo Centre, Tower Two, No. 90
Queensway, Admiralty
Hong Kong, CN

⑮ Inventor/es:

HUANG, BAOHUA ROBERT;
DAI, JIAN;
WANG, ZHONGBBO;
XIE, XUEYUAN;
LIU, XIAODONG y
HU, XINLI

⑮ Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 877 409 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados farmacológicos multiligandos y usos de los mismos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente china n.º 201510489556.6, presentada el 11 de agosto de 2015, titulada "Ligand-Drug Conjugates Capable of Inducing Endocytosis", y la solicitud de patente china n.º 201510489560.2, presentada el 11 de agosto de 2015, titulada "Multi-Ligand Drug Conjugates Capable of Inducing Endocytosis".

10 Campo técnico

15 La presente solicitud se refiere en general a compuestos conjugados, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos conjugados y el uso de los compuestos conjugados. La presente solicitud está relacionada más específicamente con conjugados farmacológicos multiligandos (mLDC), especialmente mLDC capaces de inducir endocitosis, así como sus composiciones farmacéuticas, los compuestos conjugados para suministrar cargas útiles a sujetos que lo necesiten en un medicamento y los compuestos conjugados para usar en un medicamento para tratar enfermedades.

20 Antecedentes

25 Habitualmente, las características patológicas y fisiológicas de células enfermas y células normales son significativamente diferentes y una de las diferencias es que las superficies de las células enfermas tienen materiales específicos o sobreexpresados (tales como, antígeno, señales químicas, receptores, etc.), que están ausentes o poco expresados en células normales. En función de este principio, se desarrollaron conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) y los conjugados de polipéptido-fármaco (PDC) para el tratamiento de enfermedades. En la actualidad, aunque algunos fármacos ADC y PDC se comercializaron o se sometieron a investigaciones clínicas, existen muchas limitaciones en los ADC y PDC en la clínica debido a la justificación del diseño de estos fármacos.

30 30 Los ADC han mejorado su posición recientemente con la aprobación de Adcetris de Seattle Genetics en 2011 y Kadcyla de Genentech en 2013 y sigue siendo un área de desarrollo de I + D de actualidad con más de 30 fármacos en ensayos clínicos. No obstante, el desarrollo de ADC se enfrenta a una multitud de dificultades que van desde la falta de dianas adecuadas, obstáculos de fabricación y baja estabilidad del fármaco debido a la naturaleza compleja y el gran peso molecular de los ADC. En la actualidad, los ADC se usan principalmente en el tratamiento de cánceres. En algunos casos, la afinidad del anticuerpo diana hacia el antígeno en la superficie de la célula cancerosa podría ser tan alta como $10^{-9} \sim 10^{-12}$ (Kd, mol/litro). Por lo tanto, los ADC, aunque tienen alta especificidad para las células diana, también tienen alta especificidad para las células normales con el mismo receptor o los mismos receptores diana que las células diana. Al mismo tiempo, podría llevar mucho tiempo (de una a tres semanas) metabolizar los ADC *in vivo*, durante el cual podrían destruir continuamente las células normales y, de este modo, aumentar significativamente los efectos secundarios tóxicos de los ADC. Por lo tanto, las indicaciones más ideales de ADC deberían ser las enfermedades caracterizadas por que las cantidades de antígenos de la superficie celular en las células tumorales y normales son significativamente diferentes. Sin embargo, muy pocas enfermedades conocidas en la técnica pueden cumplir un requisito tan estricto.

45 45 Otro grupo de compuestos conjugados farmacológicos son los conjugados de ligando-fármaco (LDC) donde los ligandos son péptidos o moléculas pequeñas. Sin embargo, existen diversos problemas para la aplicación de los LDC, que van desde la biodisponibilidad, la estabilidad, la eficacia, hasta la toxicidad. Por ejemplo, muchos ligandos no pueden entrar en las células debido a sus grandes pesos moleculares, lipofilia u otros atributos, limitando sus aplicaciones terapéuticas. Además, los efectos terapéuticos son generalmente bajos si los ligandos se conjugan con productos quimioterapéuticos convencionales (tales como doxorubicina, paclitaxel, etc.), mientras que las toxicidades son altas si se conjugan con moléculas farmacológicas muy eficaces (tales como MMAE, DM1) y, por tanto, dan lugar a la muerte por intoxicación del animal incluso antes de que se alcance la cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento del tumor. Takara K. *et al.*, Journal of Controlled Release, 162: 225-232 (2012) y Saul J. M. *et al.*, Journal of Controlled Release, 114: 277-287 (2006) hacen referencia a estructuras liposómicas modificadas con ligando doble para el suministro de moléculas farmacéuticas en células tumorales para ejercer efectos citotóxicos en las mismas.

Sumario de la invención

60 60 La presente solicitud se refiere a compuestos conjugados o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, sus composiciones farmacéuticas y el uso de los compuestos conjugados. La presente solicitud está relacionada más específicamente con conjugados farmacológicos multiligandos (mLDC), especialmente mLDC capaces de inducir endocitosis, así como sus composiciones farmacéuticas, los compuestos conjugados para suministrar cargas útiles a sujetos que lo necesiten y los compuestos conjugados para usar en un medicamento para tratar enfermedades, incluyendo, pero sin limitación, cánceres, enfermedades inmunológicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas y enfermedades neurológicas.

- Específicamente, un aspecto de la presente solicitud se refiere a un compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende una carga útil y dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células, en donde la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células, en donde los dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células comprenden
- 5 a) un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y un segundo ligando que se une específicamente a un segundo receptor de la superficie celular, en donde el primer y segundo receptores de la superficie celular son diferentes entre sí; o
- 10 b) un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y una molécula de endocitosis capaz de mediar en la endocitosis,
- 15 en donde el primer y segundo receptores de la superficie se seleccionan del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de ácido úrico cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), un receptor de somatostatina-14 (SST-14), un receptor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y un receptor del miembro 6 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial de receptor transitorio (TRPV6); y
- 20 la molécula de endocitosis se selecciona del grupo que consiste en folato y análogos del mismo, seleccionado del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato, y un péptido de penetración celular, seleccionado del péptido de penetración celular que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20.
- 25 Se desvela un compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende una carga útil y dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células, en donde la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células.
- 30 En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células de forma directa. En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células de forma indirecta. En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células a través de un conector. En algunas realizaciones, al menos una de las moléculas que interactúan con las células es un ligando que se une a un receptor de la superficie celular. En algunas realizaciones, al menos dos de las moléculas que interactúan con las células son ligandos que se unen a receptores de la superficie celular.
- 35 En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y un segundo ligando que se une específicamente a un segundo receptor de la superficie celular, en donde el primer receptor de la superficie celular y el segundo receptor de la superficie celular son diferentes entre sí.
- 40 En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con el primer ligando y el primer ligando se conjuga con el segundo ligando. En algunas realizaciones, el primer ligando se conjuga con el segundo ligando de forma directa. En algunas realizaciones, el primer ligando se conjuga con el segundo ligando de forma indirecta. En algunas realizaciones, el primer ligando se conjuga con el segundo ligando mediante un espaciador.
- 45 En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga directamente con cada uno del primer ligando y el segundo ligando sin ningún conector. En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con el primer ligando mediante un primer conector y la carga útil se conjuga con el segundo ligando mediante un segundo conector. En algunas realizaciones, el primer conector y el segundo conector son iguales. En algunas otras realizaciones, el primer conector y el segundo conector son diferentes. En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con el primer ligando de forma directa sin ningún conector y la carga útil se conjuga con el segundo ligando mediante un conector.
- 50 En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende además un tercer ligando que se une específicamente a un tercer receptor de la superficie celular. En algunas realizaciones, el primer receptor de la superficie celular, el segundo receptor de la superficie celular y el tercer receptor de la superficie celular son diferentes entre sí. En algunas realizaciones, al menos dos del primer receptor de la superficie celular, el segundo receptor de la superficie celular y el tercer receptor de la superficie celular, en cualquier caso, el primer receptor de la superficie celular y el segundo receptor de la superficie celular son diferentes entre sí. En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son iguales.
- 55 En algunas realizaciones, el primer y segundo receptores de la superficie se seleccionan del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de ácido úrico cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), un receptor de somatostatina-14 (SST-14), un receptor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y un receptor del miembro 6 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial de receptor transitorio (TRPV6). En algunas realizaciones, el tercer receptor de la superficie celular proporcionado en el presente documento se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de folato (FR), un receptor de ácido úrico

cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor de integrina LFA-1, receptor de somatostatina SST-14, receptor de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), receptor TRPV6 y un receptor de antígeno de superficie de proteasa.

- 5 En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en un péptido, folato y análogos de los mismos seleccionados del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato.
- 10 En algunas realizaciones, el ligando comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg (SEQ ID NO: 15, denominada P10), Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys (SEQ ID NO: 16, denominada P11), Ala-Gly-[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys], (SEQ ID NO: 17, denominada P12), Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys (SEQ ID NO: 18, denominada P13), Arg-Gly-Asp (denominada RGD), un péptido homólogo que tiene al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de homología de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las SEQ ID NO: 15-18, en donde los péptidos homólogos son equivalentes funcionales de los péptidos de las SEQ ID NO: 15-18, respectivamente.
- 15 En algunas realizaciones, al menos una de las moléculas que interactúan con las células como se describe en el presente documento es una molécula de endocitosis que es capaz de mediar en la endocitosis. En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis también se une específicamente a un receptor de la superficie celular.
- 20 La molécula de endocitosis se selecciona del grupo que consiste en folato y análogos del mismo seleccionados del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato, y un péptido de penetración celular, seleccionado del péptido de penetración celular que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20.
- 25 En algunas realizaciones, el conector proporcionado en el presente documento es un conector peptídico, un conector de disulfuro o un conector dependiente del pH.
- 30 En algunas realizaciones, el conector peptídico es escindible en un determinado entorno fisiológico mediante escisión o reducción por proteasa. En algunas realizaciones, el conector peptídico se selecciona del grupo que consiste en valina-citrulina, fenilalanina-lisina y valina-lisina.
- 35 En algunas realizaciones, el conector peptídico se selecciona del grupo que consiste en DMDS, MDS, DSDM y NDMDS.
- 40 En algunas realizaciones, el conector dependiente del pH es anhídrido cis-acónico.
- 45 En algunas realizaciones, la carga útil se selecciona del grupo que consiste en un compuesto de molécula pequeña, un nucleótido, un péptido, una proteína y una nanopartícula. En algunas realizaciones, la carga útil es un compuesto de molécula pequeña. En algunas realizaciones, la carga útil es un agente terapéutico.
- 50 En algunas realizaciones, el compuesto conjugado es un compuesto conjugado multiligando, que comprende una carga útil, dos, tres o más tipos de ligandos y, opcionalmente, un conector o un espaciador. En algunas realizaciones, el compuesto conjugado es un compuesto conjugado biligando, que comprende una carga útil, dos tipos de ligandos y, opcionalmente, un conector y/o un espaciador. En algunas realizaciones, el compuesto conjugado es un compuesto conjugado triligando, que comprende una carga útil, tres tipos de ligandos y, opcionalmente, un conector y/o un espaciador. En algunas realizaciones, el compuesto conjugado se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos: LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC12H como se muestra en la fig. 1 en el presente documento.
- 55 Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto conjugado proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía oral, por vía intramuscular, por vía parenteral o por vía intraventricular.
- 60 Otro aspecto de la presente solicitud se refiere al compuesto conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica para usar como medicamento para suministrar una carga útil a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto conjugado proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento.

Otro aspecto de la presente solicitud se refiere al compuesto conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica para usar en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto conjugado proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad inmunológica, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad metabólica y una enfermedad neurológica.

5 10 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de útero, carcinoma de endometrio, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de piel, linfoma, leucemia y mieloma múltiple.

15 20 En algunas realizaciones, la enfermedad inmunológica es una enfermedad autoinmunitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad del tejido conjuntivo, esclerosis sistémica, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

25 20 En algunas realizaciones, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en angina, infarto de miocardio, ictus, ataque cardíaco, cardiopatía hipertensiva, cardiopatía reumática, miocardiopatía, arritmia cardíaca y cardiopatía congénita.

En algunas realizaciones, la enfermedad metabólica se selecciona del grupo que consiste en diabetes, gota, obesidad, hipoglucemias, hiperglucemias y dislipidemias.

30 25 En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, lesión craneal, esclerosis múltiple, vértigo, coma y epilepsia.

35 30 En algunas realizaciones, se incluye además la administración de uno o más agentes terapéuticos en combinación con el compuesto conjugado proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se dirige a una diana terapéutica antineoplásica, induce o estimula la respuesta inmunitaria contra el cáncer o es un agente quimioterapéutico.

35 Breve descripción de las figuras

La fig. 1 muestra las estructuras de LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H y LDC12H.

40 40 La fig. 2 muestra los resultados de la prueba de endocitosis de LDC10B. Los paneles A y B muestran que el folato-FITC entra en las células KB (células positivas para el receptor de folato) pero no en las células A375 (células negativas para el receptor de folato); los paneles C y D muestran que 10A-FITC no puede entrar en las células KB ni en las células A375; los paneles E y F muestran que el conjugado biligando 10B-FITC entra en las células KB pero no en las células A375.

45 45 La fig. 3 muestra las estructuras de folato-FITC, 10A-FITC y 10B-FITC.

La fig. 4 muestra imágenes de ratones en vivo que muestran LDC10B-Cy5 marcado con fluorescencia que se concentra en el sitio tumoral.

50 Descripción detallada de la invención

50 La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que esté fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines de información. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento, diagnóstico o cirugía se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento, diagnóstico o cirugía del cuerpo humano o animal por terapia. A menos que definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que los entendidos habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente solicitud.

60 60 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Los términos "un" (o "uno/a"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se pueden usar indistintamente en el presente documento. También cabe destacar que la expresión "que comprende", "que incluye" y "que tiene" se pueden usar indistintamente.

65 65 Un aspecto de la presente solicitud se refiere a un compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende una carga útil y dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células, en donde la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células, en donde los dos o más tipos

- de moléculas que interactúan con las células comprenden un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y un segundo ligando que se une específicamente a un segundo receptor de la superficie celular, en donde el primer y segundo receptores de la superficie celular son diferentes entre sí; o un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y una molécula de endocitosis capaz de mediar en la endocitosis, en donde el primer y segundo receptores de la superficie se seleccionan del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de ácido úrico cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), un receptor de somatostatina-14 (SST-14), un receptor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y un receptor del miembro 6 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial de receptor transitorio (TRPV6); y la molécula de endocitosis se selecciona del grupo que consiste en folato y análogos del mismo, seleccionado del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato, y un péptido de penetración celular, seleccionado del péptido de penetración celular que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- La expresión "carga útil", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o material que se va a suministrar a una célula o tejido diana. Sin limitación, la carga útil puede ser cualquier compuesto farmacéutico destinado para su uso en el diagnóstico, el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un sujeto.
- En algunas realizaciones, la carga útil es un compuesto de molécula pequeña, un nucleótido (por ejemplo, ADN, ADN plasmídico, ARN, ARNip, oligonucleótidos antisentido, aptámeros, etc.), un péptido, una proteína (por ejemplo, enzimas) o una nanopartícula. En algunas realizaciones, la carga útil es un compuesto de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el compuesto de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en maitansina y cualquier derivado de la misma, taxinol y cualquier derivado del mismo, auristatinas y cualquier derivado de las mismas, epotilonas y cualquier derivado de las mismas, bleomicina y cualquier derivado de la misma, dactinomicina y cualquier derivado de la misma, plicamicina y cualquier derivado de la misma y miromicina C. En algunas realizaciones, la carga útil es auristatinas o cualquier derivado de las mismas. En algunas realizaciones, el compuesto farmacéutico es un agente quimioterapéutico que se usa para aliviar o tratar cánceres.
- En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo desvelado en el presente documento comprende una carga útil. En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo desvelado en el presente documento comprende al menos una carga útil. Por ejemplo, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, diecisésis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más cargas útiles. En una molécula conjugada que contiene múltiples cargas útiles, cada una de las cargas útiles puede ser idéntica o diferente entre sí. En algunas realizaciones, al menos dos de las cargas útiles son diferentes entre sí.
- La expresión "molécula que interactúa con las células" se refiere a cualquier molécula o resto dentro de la definición de que la molécula que interactúa con las células comprende un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y un segundo ligando que se une específicamente a un segundo receptor de la superficie celular, en donde el primer y segundo receptores de la superficie celular son diferentes entre sí; o un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y una molécula de endocitosis capaz de mediar en la endocitosis, en donde el primer y segundo receptores de la superficie se seleccionan del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de ácido úrico cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), un receptor de somatostatina-14 (SST-14), un receptor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y un receptor del miembro 6 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial de receptor transitorio (TRPV6); y la molécula de endocitosis se selecciona del grupo que consiste en folato y análogos del mismo, seleccionado del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato, y un péptido de penetración celular, seleccionado del péptido de penetración celular que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20 que puede interactuar con una célula diana o un receptor de la superficie celular de la célula diana para desencadenar o facilitar la unión específica de la molécula conjugada que contiene dicha molécula que interactúa con las células a la célula diana, endocitosis de la molécula conjugada por la célula diana y/o causar de otra manera la asociación y retención específicas de la molécula conjugada con la célula diana.
- Las moléculas que interactúan con las células pueden ser moléculas químicas pequeñas o biomoléculas grandes. En algunas realizaciones, las moléculas que interactúan con las células son anticuerpos, ligandos o moléculas de endocitosis. En algunas realizaciones, al menos una de las moléculas que interactúan con las células es un ligando que se une a un receptor de la superficie celular. En algunas realizaciones, al menos una de las moléculas que interactúan con las células es una molécula de endocitosis capaz de mediar en la endocitosis.

- Los ligandos como se desvelan en el presente documento pueden incluir una amplia variedad de entidades químicas o biológicas que pueden tener una afinidad de unión específica por una diana seleccionada, p. ej., un receptor de la superficie celular, célula, tejido, órgano, etc. En algunas realizaciones, el ligando puede unirse específicamente a una proteína o un marcador expresado en la superficie de las células diana. En algunas realizaciones, los ligandos se unen a receptores de la superficie celular con una afinidad de 10^{-6} ~ 10^{-9} (valor de K_d). En algunas realizaciones, los ligandos se unen a receptores de la superficie celular con una afinidad de al menos 10^{-7} , al menos 10^{-8} , al menos 10^{-9} M (valor de K_d). En algunas realizaciones, los ligandos se unen a receptores de la superficie celular con una afinidad que es al menos dos, tres, cuatro o más veces mayor para el receptor de la superficie celular diana que para otras proteínas o marcadores de la superficie celular no diana.
- En algunas realizaciones, los dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células son dos o más tipos de ligandos que se unen específicamente a diferentes receptores de la superficie celular. En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente solicitud contiene dos ligandos, en donde el primer ligando se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y el segundo ligando se une específicamente a un segundo receptor de la superficie celular. En algunas realizaciones, la molécula conjugada contiene dos ligandos, en donde el primer ligando se une específicamente a un receptor de folato, el segundo ligando se une específicamente a un receptor de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). En algunas realizaciones, la molécula conjugada contiene tres ligandos, en donde el primer ligando se une específicamente a un receptor de folato, el segundo ligando se une específicamente a un receptor de LHRH y el tercer ligando se une específicamente a un receptor de SST-14.
- En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo desvelado en el presente documento comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más moléculas que interactúan con las células. En una molécula conjugada, cada una de las moléculas que interactúan con las células puede ser idéntica o diferente entre sí. En algunas realizaciones, al menos dos de las moléculas que interactúan con las células son diferentes entre sí. En algunas realizaciones, cada una de las moléculas que interactúan con las células es diferente entre sí.
- En algunas realizaciones, una molécula conjugada proporcionada en el presente documento comprende solo una única carga útil conjugada con múltiples moléculas que interactúan con las células. En algunas realizaciones, una molécula conjugada proporcionada en el presente documento comprende múltiples cargas útiles conjugadas con múltiples moléculas que interactúan con las células.
- El término "conjugado" como se usa en el presente documento se refiere a la unión a través de un enlace covalente de dos grupos químicos, ya sea formando directamente un enlace covalente entre los dos grupos químicos o uniendo indirectamente los dos grupos químicos a través de un conector.
- En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende una carga útil y dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células, en donde la carga útil está unida covalentemente a al menos una de las moléculas que interactúan con las células de forma directa. En algunas realizaciones, la carga útil está unida covalentemente a cada una de las moléculas que interactúan con las células de forma directa.
- En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende una carga útil y dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células, en donde la carga útil está unida covalentemente a al menos una de las moléculas que interactúan con las células a través de un conector. En algunas realizaciones, la carga útil está unida covalentemente a cada una de las moléculas que interactúan con las células a través de un conector.
- El término "conector" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula o resto que une covalentemente una carga útil a una molécula que interactúa con las células. El conector incluye grupos funcionales para unirse a la carga útil y al menos una de las moléculas que interactúan con las células. En algunas realizaciones, los grupos funcionales pueden incluir dos restos reactivos, uno para unirse a la carga útil y el otro para unirse a la molécula que interactúa con las células. En algunas realizaciones, los grupos funcionales son diferentes entre sí. En algunas realizaciones, los grupos funcionales incluyen un grupo que contiene un resto reactivo con tiol y un resto reactivo con amina. En algunas realizaciones, los grupos funcionales son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, los grupos funcionales son grupos maleimida.
- En algunas realizaciones, los conectores son conectores multivalentes que pueden unir al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) carga útil y al menos dos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) moléculas que interactúan con las células. Las cargas útiles unidas a los conectores multivalentes pueden ser idénticas o diferentes, las moléculas que interactúan con las células unidas a los conectores multivalentes pueden ser idénticas o diferentes.
- Los conectores pueden ser lo suficientemente estables para evitar la liberación involuntaria de cargas útiles durante la circulación sanguínea para aumentar la cantidad efectiva de cargas útiles para las células o el tejido diana y evitar

la toxicidad. Los conectores pueden liberar las cargas útiles alrededor o dentro de las células diana para destruir eficazmente las células diana o bloquear las funciones de las células diana. En algunas realizaciones, el conector comprende al menos un grupo funcional escindible. Preferentemente, un grupo funcional escindible es suficientemente estable fuera de la célula diana, pero, al entrar en la célula diana, se escinde para liberar la carga útil. En algunas realizaciones, el grupo funcional escindible se escinde al menos 10, 20, 30, 50, 100 veces o más eficazmente en las células diana que en la sangre o el suero de un sujeto.

Los conectores escindibles pueden escindirse mediante hidrólisis, reacción enzimática o reacción de reducción, o mediante cambio de pH. En algunas realizaciones, el conector es escindible en un entorno fisiológico determinado, por ejemplo, en un entorno de pH adecuado. En algunas realizaciones, el conector es escindible en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o menor o mediante agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En algunas realizaciones, el conector es susceptible a agentes de escisión, por ejemplo, pH, potencial redox o la presencia de moléculas degradantes.

15 En algunas realizaciones, el conector no es escindible. Los conectores no escindibles, como se usan en el presente documento, se refieren a conectores que permanecen intactos durante el metabolismo intracelular.

En algunas realizaciones, el conector es un conector peptídico que consiste en una cadena lineal o ramificada de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones, el péptido conector es escindible mediante una proteasa que se expresa en gran medida o de forma específica alrededor de o en las células diana, por ejemplo, catepsina B en lisosoma o endosoma. Los conectores peptídicos, como se usan en el presente documento, pueden tener diversas longitudes. Normalmente, el conector peptídico tiene una longitud de entre 1 y 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, el conector peptídico es de 2 a 45, de 2 a 40, de 2 a 35, de 2 a 30, de 2 a 25, de 2 a 20, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 2 a 3 aminoácidos de longitud. El número de aminoácidos del conector peptídico como se describe en el presente documento puede ser igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico anterior, incluyendo los puntos finales del intervalo. En algunas realizaciones, se prefiere que el conector peptídico tenga una longitud de dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico es valina-citrulina (Val-Cit), fenilalanina-lisina o valina-lisina.

30 En algunas realizaciones, el conector es un conector disulfuro que contiene un enlace disulfuro. Un enlace disulfuro se puede escindir en un entorno reductor intracelular, mientras permanece estable en sistema circular. El conector de disulfuro puede ser DSDM, DMDS, MDS o NDMDS. Las estructuras de estos conectores de disulfuro se muestran en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Estructuras de DSDM, DMDS, MDS y NDMDS

En algunas realizaciones, el conector es un conector dependiente del pH. El conector dependiente del pH como se describe en el presente documento puede ser escindible en un entorno de pH determinado. En algunas realizaciones, el conector dependiente del pH puede ser estable en condiciones alcalinas, mientras es escindible en condiciones ácidas, por ejemplo, a un valor de pH de 6,5 o inferior. En algunas realizaciones, el conector dependiente del pH es anhídrido *cis*-aconítico.

En algunas realizaciones, el conector comprende uno cualquiera o una combinación de conectores como se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el conector puede contener un espaciador como parte del conector.

- 10 En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con una primera molécula que interactúa con las células de forma directa o indirecta y la primera molécula que interactúa con las células se conjuga con una segunda molécula que interactúa con las células de forma directa o indirecta. En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con cada una de la primera y la segunda molécula que interactúa con las células de forma directa. En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con cada una de la primera y la segunda molécula que interactúa con las células de forma indirecta.
- 15 En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con la primera molécula que interactúa con las células de forma indirecta, p. ej., mediante un conector, y la primera molécula que interactúa con las células se conjuga con la segunda molécula que interactúa con las células de forma directa o indirecta. En algunas realizaciones, la carga útil se conjuga con la primera molécula que interactúa con las células a través de un primer conector y la carga útil se conjuga con la segunda molécula que interactúa con las células a través de un segundo conector. En algunas realizaciones, el conector es un conector multivalente que une al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) carga útil y al menos dos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) ligandos. También se puede usar un conector multivalente para preparar una molécula conjugada que comprende múltiples cargas útiles y múltiples moléculas que interactúan con las células.
- 20 En algunas realizaciones, dos moléculas que interactúan con las células pueden unirse entre sí mediante un espaciador. En algunas realizaciones, se usan uno o más espaciadores para unir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más moléculas que interactúan con las células. En algunas realizaciones, el espaciador es escindible mediante proteasas que son expresadas de forma específica por las células diana o que se activan para ser expresadas por las células diana. Dichas proteasas incluyen, por ejemplo, las proteasas enumeradas en la tabla 2 a continuación. En algunas realizaciones, el espaciador comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos enumeradas en la tabla 2 a continuación.
- 25 En algunas realizaciones, dos moléculas que interactúan con las células pueden unirse entre sí mediante un espaciador. En algunas realizaciones, se usan uno o más espaciadores para unir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más moléculas que interactúan con las células. En algunas realizaciones, el espaciador es escindible mediante proteasas que son expresadas de forma específica por las células diana o que se activan para ser expresadas por las células diana. Dichas proteasas incluyen, por ejemplo, las proteasas enumeradas en la tabla 2 a continuación. En algunas realizaciones, el espaciador comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos enumeradas en la tabla 2 a continuación.
- 30 En algunas realizaciones, dos moléculas que interactúan con las células pueden unirse entre sí mediante un espaciador. En algunas realizaciones, se usan uno o más espaciadores para unir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más moléculas que interactúan con las células. En algunas realizaciones, el espaciador es escindible mediante proteasas que son expresadas de forma específica por las células diana o que se activan para ser expresadas por las células diana. Dichas proteasas incluyen, por ejemplo, las proteasas enumeradas en la tabla 2 a continuación. En algunas realizaciones, el espaciador comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos enumeradas en la tabla 2 a continuación.

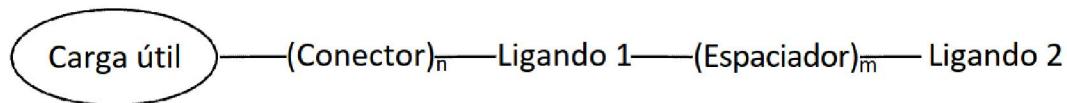
Tabla 2: Lista de secuencias escindibles enzimáticamente

Proteasa	Secuencia de aminoácidos del sitio de reconocimiento	SEQ ID NO.
Catepsina B	RR	-
Legumaína	ASN	-
Matripasa	KSRAEDE	SEQ ID NO: 1
MMP-2	PLGLAG	SEQ ID NO: 2
Antígeno específico de próstata	SSLY	SEQ ID NO: 3
Estromelisina-3	AAA	-
TMPRSS2	LLRSLIG	SEQ ID NO: 4
Activador de plasminógeno de tipo urocinasa	SSR	-
Proteína C activada	LVKR	SEQ ID NO: 5
Factor Ixa	LVVR	SEQ ID NO: 6
Factor VIIa	QLTR	SEQ ID NO: 7
Factor Xa	LEGR	SEQ ID NO: 8
Trombina	RP	-
Calpaína-a	PLFAEP	SEQ ID NO: 9
Calpaína-2	GLGSEP	SEQ ID NO: 10
Enteropeptidasa	DDDDK	SEQ ID NO: 11
MMP-8	GPSG	SEQ ID NO: 12
Catepsina L	PLG	-
Proteína convertasa 5	RSKR	SEQ ID NO: 13
Calpaína-3	VGVF	SEQ ID NO: 14

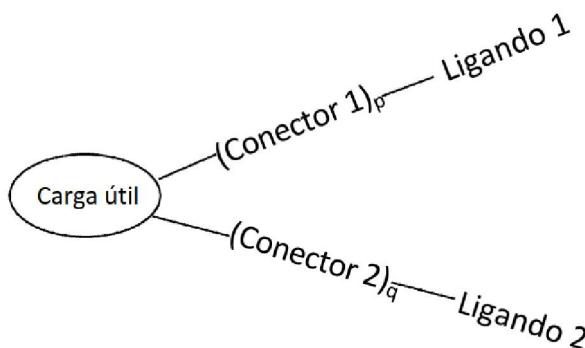
- 35 Los términos "escindible" o "escindido" como se usan en el presente documento se refieren a un proceso metabólico o proceso de reacción en el compuesto conjugado proporcionado en el presente documento, de modo que el conector entre la carga útil y la molécula que interactúa con las células o el espaciador entre las moléculas que interactúan con las células se rompen para liberar la carga útil libre o la molécula que interactúa con las células. El conector y el espaciador se escinden mediante proteasas o se escinden en un entorno fisiológico determinado, p. ej., entorno de pH.
- 40 Los términos "escindible" o "escindido" como se usan en el presente documento se refieren a un proceso metabólico o proceso de reacción en el compuesto conjugado proporcionado en el presente documento, de modo que el conector entre la carga útil y la molécula que interactúa con las células o el espaciador entre las moléculas que interactúan con las células se rompen para liberar la carga útil libre o la molécula que interactúa con las células. El conector y el espaciador se escinden mediante proteasas o se escinden en un entorno fisiológico determinado, p. ej., entorno de pH.

En algunas realizaciones, el compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo contiene una carga útil conjugada con tres ligandos, en donde el primer ligando se une específicamente a un primer receptor celular, el segundo ligando se une específicamente a un segundo receptor celular y el tercer ligando se une específicamente a un tercer receptor de la superficie celular.

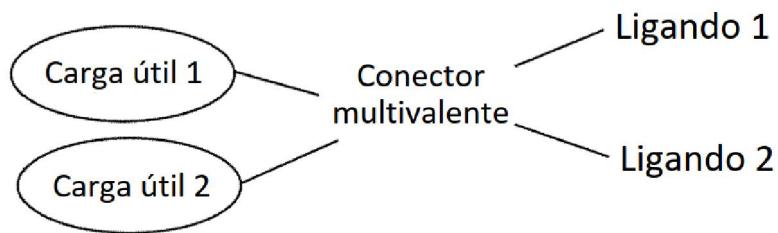
- 5 En algunas realizaciones, el tercer ligando se conjuga con el primer ligando de forma directa o indirecta, p. ej., a través de un espaciador. En algunas realizaciones, el tercer ligando se conjuga con la carga útil de forma directa o indirecta, p. ej., a través de un conector. En algunas realizaciones, el primer ligando se conjuga con el segundo ligando de forma directa o indirecta, p. ej., a través de un espaciador, y el segundo ligando se conjuga con el tercer ligando de forma directa o indirecta, p. ej., a través de un espaciador.
- 10 En algunas realizaciones, el primer receptor de la superficie celular, el segundo receptor de la superficie celular y el tercer receptor de la superficie celular son diferentes entre sí, ya sea en estructuras o funciones. En algunas realizaciones, al menos dos del primer receptor de la superficie celular, el segundo receptor de la superficie celular y el tercer receptor de la superficie celular son diferentes entre sí, ya sea en estructuras o funciones. En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son iguales.
- 15 En algunas realizaciones, la molécula conjugada tiene las estructuras de fórmula I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX o X mostradas a continuación, en donde n, m, p, q, r y s son de forma independiente 0 o 1, que representan que el conector y el espaciador están presentes o ausentes de forma independiente.
- 20



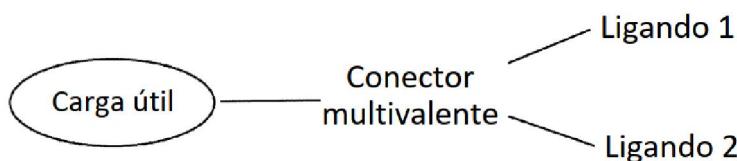
(Fórmula I)



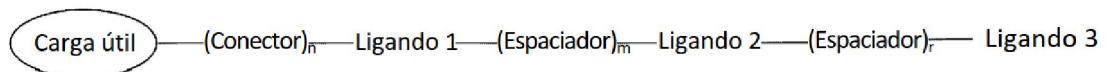
(Fórmula II)



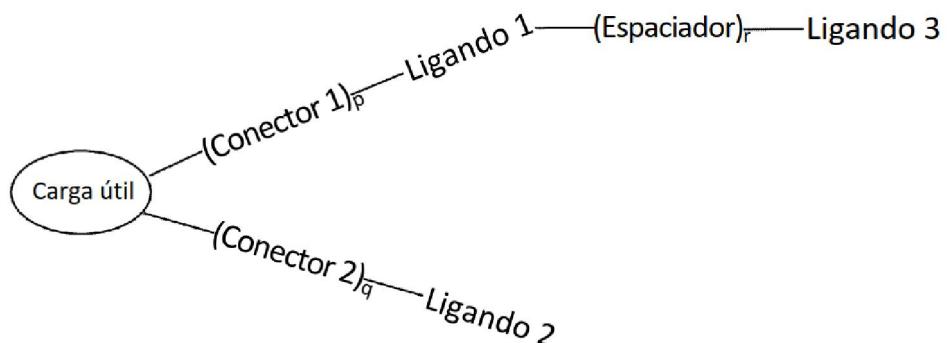
(Fórmula III)



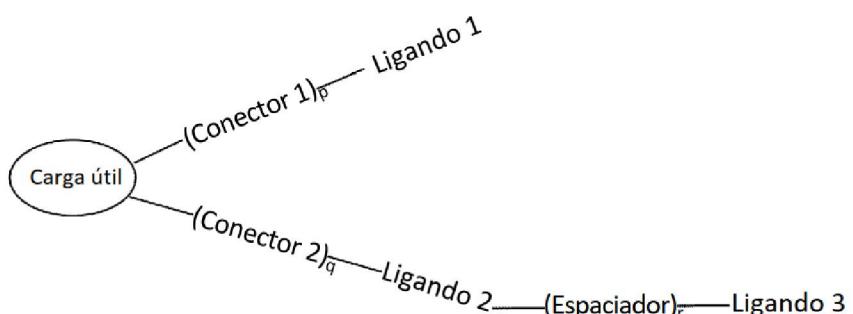
(Fórmula IV)



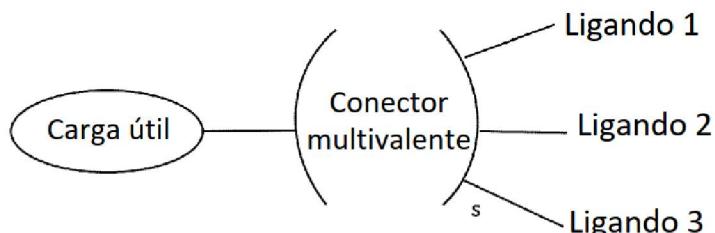
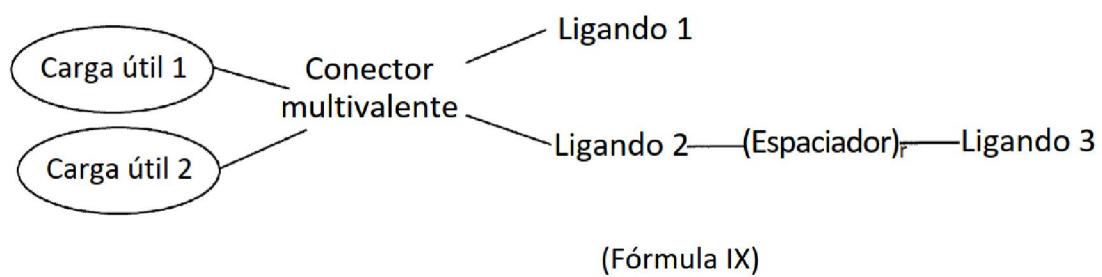
(Fórmula V)



(Fórmula VI)



(Fórmula VII)



(Fórmula X)

En realizaciones preferidas, las expresiones de los receptores de la superficie celular son significativamente más altas en las células diana (p. ej., células cancerosas) que en las células normales. El término "significativamente" como se usa en el presente documento se refiere a diferencias estadísticamente significativas o diferencias significativas que pueden ser reconocidas por una persona experta en la materia.

- 5 En algunas realizaciones, los niveles de expresión de los receptores de la superficie celular son 2-1 000 000 de veces más altos en las células diana (p. ej., células cancerosas) que en las células normales, por ejemplo, 2-10, 2-100, 2-1000, 2-10 000, 2-100 000, 2-1 000 000 de veces (pueden ser iguales a cualquier valor dentro del intervalo numérico anterior, incluyendo los puntos finales del intervalo) más altos en las células diana (p. ej., células cancerosas) que en las células normales. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de los receptores de la superficie celular son al menos 10 veces mayores, o 100 veces mayores, o 1000 veces mayores, o 10 000 veces mayores o 100 000 veces mayores en las células diana (p. ej., células cancerosas) que en las células normales. En algunas realizaciones, el nivel del receptor de la superficie celular en las células normales se reduce en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con el nivel del receptor de la superficie celular en las células diana (p. ej., células cancerosas). En algunas realizaciones, los receptores de la superficie celular descritos en el presente documento son indetectables en células normales.
- 10 En algunas realizaciones, el primer, segundo y tercer receptor de la superficie celular se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de folato (FR), un receptor de ácido úrico cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor de integrina LFA-1, receptor de SST-14, receptor de LHRH, receptor TRPV6 y un receptor de antígeno de superficie de proteasa.
- 15 En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son iguales. En algunas realizaciones, al menos dos del primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son diferentes entre sí. El primer ligando y el segundo ligando se unen específicamente a diferentes receptores de la superficie celular. En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando se unen específicamente a diferentes receptores
- 20 En algunas realizaciones, el primer, segundo y tercer receptor de la superficie celular se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de folato (FR), un receptor de ácido úrico cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor de integrina LFA-1, receptor de SST-14, receptor de LHRH, receptor TRPV6 y un receptor de antígeno de superficie de proteasa.
- 25 En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son iguales. En algunas realizaciones, al menos dos del primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son diferentes entre sí. El primer ligando y el segundo ligando se unen específicamente a diferentes receptores de la superficie celular. En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando se unen específicamente a diferentes receptores

de la superficie celular. En algunas realizaciones, cada uno del primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando se unen a dos o más receptores de la superficie celular diferentes.

5 En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en folato, y análogos del mismo, y un péptido. En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son de forma independiente folato o análogos del mismo y al menos dos de los ligandos son diferentes entre sí. Los análogos de folato se seleccionan del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato.

- 10 10 En algunas realizaciones, el primer ligando, el segundo ligando y el tercer ligando son de forma independiente péptidos. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, RGD, un péptido homólogo que tiene al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de homología de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las SEQ ID NO: 15-18, en donde los péptidos homólogos son equivalentes funcionales de los péptidos de las SEQ ID NO: 15-18, respectivamente.

20 20 La expresión "porcentaje (%) de homología con" como se usa en el presente documento se refiere, para las secuencias de aminoácidos, al porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos después de alinear el candidato y las secuencias de referencia y, si es necesario, introducir huecos, para lograr el número máximo de aminoácidos idénticos; para la secuencia de nucleótidos, al porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos después de alinear el candidato y las secuencias de referencia y, si es necesario, introducir huecos, para lograr el número máximo de nucleótidos idénticos.

25 25 30 35 35 El porcentaje de homología se puede determinar mediante diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la comparación de secuencia se puede lograr mediante las siguientes herramientas disponibles públicamente: programa informático BLASTp (disponible en el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, véanse también, Altschul S. F. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990); Stephen F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997), ClustalW2 (disponible en el sitio web del Instituto Europeo de Bioinformática: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/dustalw2/>, véanse también, Higgins D. G. *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266: 383-402 (1996); Larkin M. A. *et al.*, *Bioinformatics* (Oxford, Inglaterra), 23 (21): 2947-8 (2007)) y Tcoffee (disponible en el sitio web del Instituto de Bioinformática de Suecia, véanse también, Poirot O. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31 (13): 3503-6 (2003); Notredame C. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 302 (1): 205-17 (2000)). Si la alineación de las secuencias se realiza usando un programa informático, se pueden usar los parámetros predeterminados disponibles en el programa informático o, de otro modo, los parámetros se pueden personalizar para adaptarse al objetivo de la alineación. Todos estos están dentro del alcance del conocimiento de una persona experta en la materia.

40 45 La expresión "equivalente funcional" como se usa en el presente documento se refiere a un péptido derivado que conserva una actividad biológica que es sustancialmente similar a la de la secuencia peptídica original de la que procede el péptido derivado. Un equivalente funcional puede ser un derivado natural o se prepara de forma sintética. Los equivalentes funcionales ilustrativos incluyen secuencias de aminoácidos que tienen sustituciones, supresiones o inserciones de uno o más aminoácidos, siempre que se conserve la actividad biológica del péptido. El aminoácido de sustitución tiene convenientemente propiedades fisicoquímico que son similares a las del aminoácido sustituido. Las propiedades fisicoquímicas similares deseables incluyen similitudes en la carga, voluminosidad, hidrofobicidad, hidrofilia y similares.

50 55 En algunas realizaciones, los equivalentes funcionales incluyen la sustitución conservadora de restos de aminoácidos. La sustitución conservadora de restos de aminoácidos se refiere a la sustitución entre aminoácidos con propiedades similares, por ejemplo, la sustitución entre aminoácidos polares (tal como la sustitución entre glutamina y asparagina), la sustitución entre aminoácidos hidrófobos (tal como la sustitución entre leucina, isoleucina, metionina y valina), así como la sustitución entre aminoácidos con cargas idénticas (tal como la sustitución entre arginina, lisina e histidina, o la sustitución entre ácido glutámico y ácido aspártico), etc.

60 En algunas realizaciones, al menos una de las moléculas que interactúan con las células del compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es una molécula de endocitosis capaz de mediar en la endocitosis.

65 La expresión "molécula de endocitosis" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que puede mediar en la endocitosis, internalización o captación del compuesto conjugado desvelado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en las células diana después de que dicha molécula interaccione con las células diana.

Con respecto al primer y segundo ligando, la molécula de endocitosis se selecciona del grupo que consiste en folato y análogos del mismo seleccionados del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato, y un péptido de penetración celular seleccionado del péptido de penetración celular que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20. De otro modo, la

molécula de endocitosis puede seleccionarse del grupo que consiste en folato y análogos del mismo, un péptido capaz de mediar en la endocitosis y un péptido de penetración celular.

En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis también se une específicamente a un receptor de la superficie celular. En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis proporcionada en el presente documento es folato o análogos del mismo. En algunas realizaciones, los análogos de folato se seleccionan del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, sulfanilamida, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato.

El folato es beneficioso para formar enlaces químicos con los otros grupos debido a su pequeño peso molecular, ausencia de inmunogenicidad y buena estabilidad. El folato se puede asociar con receptores de folato expresados en la superficie celular con alta afinidad para mediar en la captación celular de folato. Aunque se expresan en niveles muy bajos en la mayoría de las células normales, los receptores de folato se expresan en niveles altos en numerosas células cancerosas para satisfacer la alta demanda de folato de las células que se dividen rápidamente en condiciones de bajo contenido de folato (véase Kelemen LE, Int J Cancer, 2006; 119: 243-50; Kane MA, *et al.*, J Clin Invest. 1988; 81: 1398-406; Matsue H, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 6006-9; Zhao R, *et al.*, Annu Rev Nutr. 2011; 31: 177-201). El folato se une específicamente a los receptores de folato en la superficie celular y también es una molécula de endocitosis capaz de mediar en la endocitosis del compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en las células diana.

En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis es un péptido capaz de mediar en la endocitosis. En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis se une además específicamente a un receptor de la superficie celular. En algunas realizaciones, el péptido capaz de mediar en la endocitosis comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, RGD, un péptido homólogo que tiene al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de homología de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las SEQ ID NO: 16-18, en donde los péptidos homólogos son equivalentes funcionales de los péptidos de las SEQ ID NO: 16-18, respectivamente.

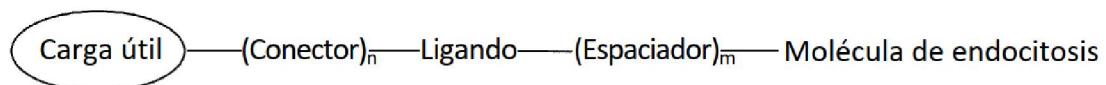
En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis es un péptido de penetración celular. Los péptidos de penetración celular (PPC), también conocidos como dominios de transducción de proteínas (DTP), son péptidos cortos (generalmente de menos de 40 aminoácidos), con la capacidad de acceder al interior de las células de manera independiente del receptor. Los péptidos de penetración celular, cuando se conjugan con cargas útiles, son capaces de mediar en el transporte transmembrana de las cargas útiles y tienen la actividad de transducción de proteínas. En algunas realizaciones, los péptidos de penetración celular como se describen en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en un péptido de dirección tumoral, un péptido de penetración mitocondrial, un péptido de penetración celular activable y un péptido antibacteriano. En algunas realizaciones, el péptido de penetración celular comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 19 (RRRRRRRRR, denominada R9) y SEQ ID NO: 20 (GRKKRQRRPPQ, que es un péptido Tat, es decir, el péptido de penetración celular del transactivador de la proteína de transcripción del VIH).

En algunas realizaciones, el péptido capaz de mediar en la endocitosis como se describe en el presente documento tiene una sustitución conservadora de aminoácidos en un solo sitio de aminoácido en comparación con las secuencias de las SEQ ID NO: 16-20, RGD. En algunas realizaciones, el péptido capaz de mediar en la endocitosis como se describe en el presente documento tiene una sustitución conservadora de aminoácidos en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sitios de aminoácidos en comparación con las secuencias de las SEQ ID NO: 16-20.

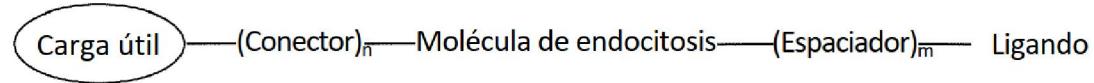
Con la condición previa de no alterar su actividad biológica, el péptido capaz de mediar en la endocitosis como se describe en el presente documento también puede contener aminoácidos de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, β -fluoro-alanina, 1-metil-histidina, ácido γ -metilen-glutámico, α -metil-leucina, 4,5-deshidro-lisina, hidroxiprolina, 3-fluoro-fenilalanina, 3-amino-tyrosina, 4-metil-triptófano y similares.

En algunas realizaciones, el compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez y más) carga útil como se proporciona en el presente documento, al menos un (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez y más) ligando como se proporciona en el presente documento, al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez y más) molécula de endocitosis como se proporciona en el presente documento y, opcionalmente, un conector o espaciador como se proporciona en el presente documento. En algunas realizaciones, el compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende una carga útil como se proporciona en el presente documento, un ligando como se proporciona en el presente documento, una molécula de endocitosis como se proporciona en el presente documento y, opcionalmente, un conector o espaciador como se proporciona en el presente documento.

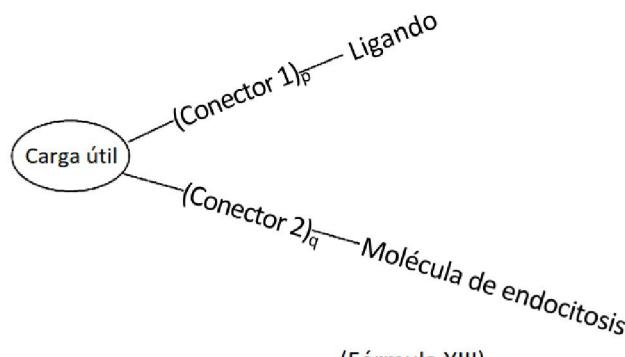
En algunas realizaciones, el compuesto conjugado tiene las estructuras de fórmula XI, XII, XIII, XIII o XV mostradas a continuación, en donde n, m, p, q y s son de forma independiente 0 o 1, que representan que el conector, el conector multivalente y el espaciador están presentes o ausentes de forma independiente.



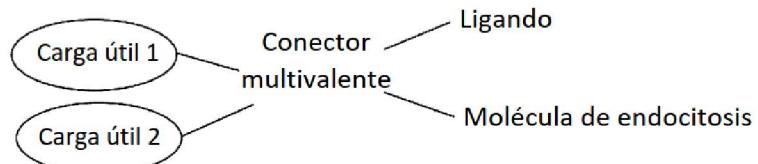
(Fórmula XI)



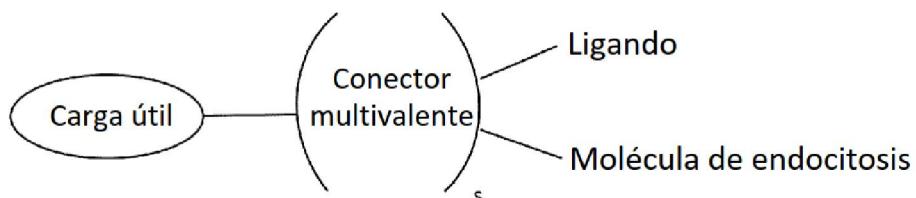
(Fórmula XII)



(Fórmula XIII)



(Fórmula XIV)



(Fórmula XV)

5

En algunas realizaciones, el compuesto conjugado de la presente solicitud se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos: LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC12H, LDC13H. Los componentes de LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H y LDC12H se muestran en la tabla 3 a continuación.

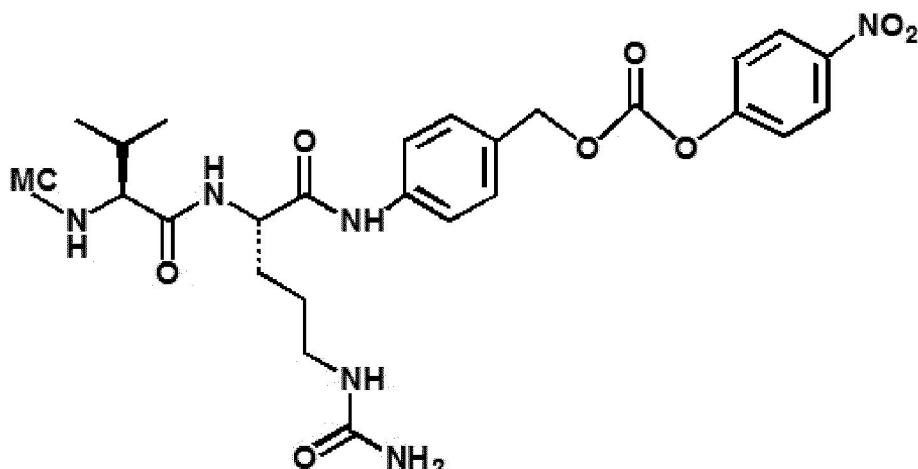
Tabla 3: Componentes de los compuestos conjugados

Nombre del compuesto conjugado	Moléculas que interactúan con las células	Conector	Carga útil
LDC10B	Folato; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE

(continuación)

Nombre del compuesto conjugado	Moléculas que interactúan con las células	Conejor	Carga útil
LDC10BR	Folato; P10; RGD	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BX	Folato; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11B	Folato; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12B	Folato; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13B	Folato; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC1013	P10; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10H	R9; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11H	R9; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12H	R9; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13H	R9; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE

La estructura de MC-Val-Cit-PAB es la siguiente:



5

Las estructuras específicas de LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H y LDC12H se muestran en la fig. 1.

10 En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una carga útil y dos moléculas que interactúan con las células, en donde una es un ligando que se une específicamente a un receptor de la superficie celular y la otra es una molécula de endocitosis, por ejemplo, LDC10H, LDC10B, LDC1013. En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis también se une a un receptor de la superficie celular, por ejemplo, LDC10B, LDC1013. En algunas realizaciones, la molécula de endocitosis es una molécula de penetración celular, por ejemplo, LDC10H.

20 En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una carga útil y dos moléculas que interactúan con las células, que son ambas moléculas de endocitosis, por ejemplo, LDC11B, LDC12B, LDC13B. En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una primera molécula de endocitosis y una segunda molécula de endocitosis, en donde la primera molécula de endocitosis es igual que la segunda molécula de endocitosis. En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una primera molécula de endocitosis y una segunda molécula de endocitosis, en donde la primera molécula de endocitosis es diferente de la segunda molécula de endocitosis, por ejemplo, LDC11B, LDC12B, LDC13B. En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una carga útil y dos moléculas que interactúan con las células, que son ambas moléculas de endocitosis que también se unen específicamente a los receptores de la superficie celular, por ejemplo, LDC11B, LDC12B, LDC13B. En algunas realizaciones, la primera molécula de endocitosis también se une específicamente a un receptor

de la superficie celular y la segunda molécula de endocitosis es una molécula de penetración celular, por ejemplo, LDC11H, LDC12H, LDC13H.

5 En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una carga útil y dos moléculas que interactúan con las células, que son ambas ligandos que se unen específicamente a los receptores de la superficie celular. En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una primera molécula que interactúa con las células que se une a un primer receptor de la superficie celular y una segunda molécula que interactúa con las células que se une a un segundo receptor de la superficie celular, en donde la primera molécula que interactúa con las células es igual que la segunda molécula que interactúa con las células. En algunas realizaciones, un compuesto conjugado proporcionado en el presente documento o sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprende una primera molécula que interactúa con las células que se une a un primer receptor de la superficie celular y una segunda molécula que interactúa con las células que se une a un segundo receptor de la superficie celular, en donde la primera molécula que interactúa con las células es diferente de la segunda molécula que interactúa con las células, por ejemplo, LDC10B, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013.

10

15

20 El mLDC de la presente solicitud puede usarse para suministrar específicamente cualquier carga útil a las células diana en el entorno del tejido diana. En general, la ventaja de tener múltiples ligandos en el mLDC es triple. En primer lugar, múltiples ligandos pueden actuar en múltiples modos, con frecuencia de forma sinérgica, lo que da lugar a un efecto terapéutico mejorado mientras se reducen los efectos secundarios. En segundo lugar, la unión de múltiples ligandos aumenta la afinidad y la avidez de un mLDC hacia los receptores diana o las células diana, mejorando de este modo su especificidad y evitando la toxicidad fuera de diana. Por último, cuando está correctamente diseñada, la combinación de múltiples ligandos puede cumplir con el requisito multifuncional que con frecuencia se requiere del conjugado farmacológico.

25

30 El mLDC de la presente solicitud logra efectos técnicos inesperados, incluyendo, pero sin limitación: (1) la combinación del ligando que se une a los receptores de la superficie celular y la molécula de endocitosis permite que el compuesto conjugado entre específicamente en las células diana; (2) mLDC mejora la afinidad y la especificidad de dirección de los compuestos farmacológicos para suministrar agentes quimioterapéuticos muy eficaces tales como MMAE al paciente, ampliar la ventana terapéutica de dichos agentes y evitar efectos secundarios; (3) el conector puede evitar la liberación de la carga útil fuera de las células diana (por ejemplo, sistema de circulación sanguínea, sustancia intercelular, etc.), lo que garantiza la estabilidad del compuesto conjugado durante la circulación sanguínea y reduce la toxicidad del fármaco. Después de entrar en las células diana, el conector se escinde para liberar la carga útil y ejercer el efecto del fármaco. Al mismo tiempo, es posible evitar la multirresistencia (MDR); (4) se puede administrar una amplia diversidad de fármacos en forma de compuestos conjugados de la presente solicitud y, por lo tanto, se amplía el alcance de las aplicaciones de los fármacos relevantes. Por lo tanto, los mLDC de la presente solicitud no solo amplían el alcance del direccionamiento y la ventana terapéutica de los fármacos de LDC, sino que también reducen la toxicidad y los efectos secundarios de algunos fármacos.

35

40

45

40 Por ejemplo, se pueden usar ligandos dobles en un conjugado en donde un ligando se une específicamente a un receptor de superficie de la célula cancerosa, mientras que el otro ligando, desenmascarado solo dentro de un tumor sólido por proteasas específicas del cáncer, desencadena la endocitosis, lo que permite que el conjugado suministre específicamente la carga útil del fármaco solo a las células cancerosas, evitando la toxicidad hacia las células normales que expresan uno o ambos receptores.

50 Por ejemplo, LDC10B que contiene dos ligandos, péptido P10 y folato, puede actuar en modo doble e incluso en modo triple. Se ha mostrado en un ensayo de fase I que el péptido P10 en sí es un fármaco eficaz contra el cáncer, que actúa quizás como un antagonista de TRPV6 y se ha mostrado que el folato ayuda a suministrar cargas útiles de citotoxina de manera eficiente a través de la endocitosis para destruir las células cancerosas. Como conjugado farmacológico de ligando doble, LDC10B puede actuar potencialmente de forma sinérgica de las siguientes tres formas para destruir las células cancerosas que expresan los receptores tanto de TRPV6 como de folato. En primer lugar, la parte del péptido P10 actúa en sí como un antagonista de TRPV6. En segundo lugar, el péptido P10 puede potencialmente suministrar la citotoxina conjugada mediante internalización, aunque no de forma muy eficiente; y el folato puede unirse al receptor de folato para suministrar citotoxinas de manera eficiente mediante endocitosis. Por último, los ligandos dobles, el péptido P10 y el folato podrían unirse de forma sinérgica a sus respectivos receptores y suministrar la carga útil de citotoxina al interior de las células diana que expresan ambos receptores.

55

60 Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido", como se usan en el presente documento, se pueden usar indistintamente y se refieren al polímero de aminoácidos. El polipéptido, proteína o péptido como se describe en el presente documento puede contener aminoácidos de origen natural, así como aminoácidos de origen no natural o análogos y miméticos de aminoácidos. El polipéptido, la proteína o el péptido pueden obtenerse mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, aislamiento y purificación de materiales naturales, expresión recombinante, síntesis química, etc.

65

Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a composiciones farmacéuticas que comprende el compuesto conjugado proporcionado en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente significa que es, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuado para su uso en contacto con las células de seres humanos y otros animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionadas con una relación beneficio/riesgo razonable.
- 10 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" como se usa en el presente documento se refiere a las sales de adición de ácidos y sales de adición de bases orgánicas e inorgánicas, relativamente no tóxicas, de los compuestos conjugados de la presente solicitud. Las sales de adición de ácidos representativas incluyen el bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, 15 lacticionato, sulfamatos, malonatos, salicilatos, propionatos, metilen-bis-b-hidroxinaftoatos, gentisatos, isetionatos, di-p-toluoltartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos, ciclohexilsulfamatos y sales de quinatoslaurilsulfonato, y similares. Las sales de adición de bases incluyen sales de amina y metálicas farmacéuticamente aceptables. Las sales metálicas adecuadas incluyen las sales de sodio, potasio, calcio, bario, cinc, magnesio y aluminio. En algunas realizaciones, se prefieren las sales de sodio y de potasio. Las sales de adición de 20 bases inorgánicas adecuadas se preparan a partir de bases metálicas que incluyen, por ejemplo, hidruro de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio e hidróxido de cinc. Se preparan sales de adición de bases de amina adecuadas a partir de aminas que tienen suficiente alcalinidad para formar una sal estable y preferentemente incluyen las siguientes aminas que se usan con frecuencia en química médica debido a su baja toxicidad y aceptabilidad para uso médico: amoníaco, etilendiamina, N-metil-glucamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencifenetilamina, dietilamina, piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio, trietilamina, dibencilamina, efenamina, deshidroabietilamina, N-etilpiperidina, bencilamina, 25 tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, aminoácidos básicos, p. ej., lisina y arginina, y cicloclohexilamina y similares.
- 30 La expresión "vehículos farmacéuticamente aceptables" como se usa en el presente documento se refiere a disolventes farmacéuticamente aceptables, agentes de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar los compuestos conjugados proporcionados en el presente documento a sujetos, que no interfieren con las estructuras y propiedades de los compuestos conjugados. Algunos de estos vehículos permiten que 35 los compuestos conjugados se formulen como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y pastillas, para ingestión oral por sujetos. Algunos de estos vehículos pueden permitir que los compuestos conjugados se formulen como inyecciones, infusiones o administración local.
- 40 Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden incluir, pero sin limitación, por ejemplo, líquidos farmacéuticamente aceptables, geles o vehículos sólidos, vehículos acuosos (tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección isotónica de dextrosa, inyección de agua estéril o inyección de dextrosa y Ringer con lactato), vehículos no acuosos (tales como aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo o aceite de cacahuete), agentes antimicrobianos, agentes isotónicos (tales como cloruro de sodio o dextrosa), tampones (tales 45 como tampones de fosfato o citrato), antioxidantes (tales como bisulfato de sodio), anestésicos (tales como clorhidrato de procaína), agentes de suspensión/distribución (tales como carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropil metilcelulosa o polivinilpirrolidona), agentes quelantes (tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o EGTA (ácido etilenglicoltetraacético)), agentes emulsionantes (tales como polisorbato 80 (TWEEN-80)), diluyentes, adyuvantes, 50 excipientes o sustancias adyuvantes no tóxicas, otros componentes conocidos en la técnica o diversas combinaciones de los mismos. Los componentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, cargas, aglutinantes, tampones, conservantes, lubricantes, aromatizantes, espesantes, agentes colorantes o emulsionantes.
- 55 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son formulaciones inyectables. Las formulaciones inyectables incluyen soluciones o dispersiones de agua estéril, suspensiones o emulsiones. En todos los casos, las formulaciones inyectables deben ser estériles y serán fluidas para facilitar la inyección. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Los vehículos pueden ser disolventes o medio de dispersión que contengan, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. Las formulaciones de inyección deben mantener la fluidez adecuada.
- 60 La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de recubrimientos tales como lecitina, mediante el uso de tensioactivos y similares. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.
- 65 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son formulaciones orales. Las formulaciones orales incluyen, pero sin limitación, cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base

aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o de tragacanto), polvos, gránulos o como soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos, o como emulsiones líquidas de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixires o jarabes, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga) y/o en forma de colutorios y similares.

5 En formas farmacéuticas sólidas para administración oral (p. ej., cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), los compuestos conjugados se mezclan con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silílico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, 10 alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol acetílico y/o monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, 15 estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes.

20 En formas de dosificación líquidas para administración oral, los compuestos conjugados se mezclan con cualquiera de los siguientes: emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Además de los compuestos conjugados, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, 25 maíz, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

30 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son formulaciones de pulverización bucal o formulaciones de pulverización nasal. Las formulaciones de pulverización incluyen, pero sin limitación, aerosoles acuosos, suspensiones no acuosas, formulaciones de lipidosomas o preparaciones granulares sólidas, y similares. Los aerosoles acuosos se preparan mezclando soluciones o suspensiones acuosas de agentes y vehículos y estabilizadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Los vehículos y estabilizadores se cambian según los 35 requisitos de compuestos específicos, pero, en general, incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens o polietilenglicol), ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, solución de tampón, sales, azúcar o alcohol de azúcar. Los aerosoles se preparan en general mediante soluciones isotónicas y pueden suministrarse mediante pulverizadores.

40 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se puede usar mezclándola con uno o más fármacos adicionales. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos otro fármaco. En algunas realizaciones, los otros fármacos son fármacos antineoplásicos, fármacos cardiovasculares, fármacos antiinflamatorios, fármacos antiviricos, fármacos para el aparato digestivo, fármacos para el sistema nervioso, fármacos para el sistema respiratorio, fármacos para el sistema inmunitario, fármacos dermatológicos, fármacos metabólicos y similares.

45 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a sujetos que lo necesiten por vías adecuadas, incluyendo, sin limitación, administración oral, inyección (tal como inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intracardíaca, intratecal, intrapleural, intraperitoneal y similares), mucosa (tal como administración nasal, intraoral y similares), sublingual, rectal, percutánea, intraocular y pulmonar. En algunas realizaciones, las composiciones farmacológicas se pueden administrar por vía intravenosa, por vía subcutánea, por 50 vía oral, por vía intramuscular o por vía intraventricular.

55 Debido a las propiedades de algunas cargas útiles, por ejemplo, alta toxicidad, alta hidrofilia, se desea suministrar las cargas útiles de manera más específica y más eficiente a los sujetos que las necesiten. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, se desea suministrar los agentes quimioterapéuticos a las células cancerosas específicamente, sin toxicidad para las células normales. Por lo tanto, otro aspecto de la presente solicitud se refiere a los compuestos conjugados proporcionados en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o las 60 composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento para uso de un medicamento para suministrar una carga útil a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos conjugados proporcionados en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptable de los mismos, o las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento. La carga útil descrita en el presente documento puede ser cualquier agente farmacéutico que provoque la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano que busca un investigador, veterinario, médico u otros especialistas clínicos en la prevención, inhibición, alivio o tratamiento de una enfermedad.

65 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos. El sujeto también

puede ser un animal de ganado tal como, ganado bovino, cerdo, oveja, ave de corral y caballo, o animal doméstico tal como perro y gato. El sujeto puede ser de sexo masculino o femenino, puede ser anciano y puede ser un adulto, adolescente, niño o bebé. Un sujeto humano puede ser caucásico, africano, asiático, semítico u otra raza, o una mezcla de dichas razas.

5 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de los compuestos conjugados, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o composiciones farmacéuticas que alivian en cierta medida uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno en un sujeto; devuelve a la normalidad, ya sea parcial o completamente, uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de la enfermedad o el trastorno; y/o reduce la probabilidad de aparición de la enfermedad o el trastorno. Dichas cantidades varían en general según varios factores dentro del alcance de los expertos habituales en la materia, dada la descripción proporcionada en el presente documento para determinar y tener en cuenta. Estos incluyen, sin limitación: el sujeto en particular, así como su edad, peso, altura, condición física general e historial médico, el compuesto particular usado, así como el vehículo en el que se formula y la vía de administración seleccionada para ello; y, la naturaleza y gravedad de la afección que se trata.

20 En algunas realizaciones, las cantidades de los compuestos conjugados, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o las composiciones farmacéuticas son suficientes para inhibir una enfermedad o un trastorno en un sujeto, o inhibir profilácticamente o prevenir la aparición de una enfermedad o un trastorno. Aunque la cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en diferentes sujetos, esta varía, en general, entre 0,01 y 100 mg/kg, por ejemplo, entre 0,01 y 90 mg/kg, entre 0,01 y 80 mg/kg, entre 0,01 y 70 mg/kg, entre 0,01 y 60 mg/kg, entre 0,01 y 50 mg/kg, entre 0,01 y 40 mg/kg, entre 0,01 y 30 mg/kg, entre 0,01 y 20 mg/kg, entre 0,01 y 10 mg/kg, entre 0,01 y 5 mg/kg, entre 0,01 y 4 mg/kg, entre 0,01 y 3 mg/kg, entre 0,01 y 2 mg/kg, entre 0,01 y 1 mg/kg, entre 0,01 y 0,1 mg/kg. La cantidad terapéuticamente eficaz como se describe en el presente documento puede ser igual a cualquier valor dentro del intervalo numérico anterior, incluyendo los puntos finales del intervalo.

25 Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a los compuestos conjugados proporcionados en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento para su uso como un medicamento para suministrar una carga útil a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos conjugados proporcionados en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento.

30 Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a los compuestos conjugados proporcionados en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento para su uso en métodos para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos conjugados proporcionados en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptable de los mismos, o las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento.

35 40 En algunas realizaciones, la enfermedad es un cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de útero, carcinoma de endometrio, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de piel, linfoma, leucemia y mieloma múltiple.

45 En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad inmunológica, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad del tejido conjuntivo, esclerosis sistémica, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

50 En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular, incluyendo, pero sin limitación, angina, infarto de miocardio, ictus, cardiopatía hipertensiva, incluyendo, pero sin limitación, angina, infarto de miocardio, ictus, ataque cardíaco, cardiopatía hipertensiva, cardiopatía reumática, miocardiopatía, arritmia cardíaca y cardiopatía congénita.

55 En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad metabólica, incluyendo, pero sin limitación, diabetes, gota, obesidad, hipoglucemia, hiperglucemia y dislipidemia.

60 En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad neurológica, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, lesión craneal, esclerosis múltiple, vértigo, coma y epilepsia.

65 En algunas realizaciones, se incluye además la administración de uno o más agentes terapéuticos en combinación con el compuesto conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se dirige a una diana terapéutica antineoplásica, induce o estimula la respuesta inmunitaria contra el cáncer o es un agente quimioterapéutico.

La presente solicitud se describirá con más detalle por medio de ejemplos específicos.

Ejemplos

- 5 Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar adicionalmente la presente solicitud. Las ventajas y características de la presente solicitud resultarán evidentes a partir de las descripciones.

EJEMPLO I: Preparación de moléculas conjugadas

10 Etapa I: Síntesis de folato-NHS

Se disolvió folato (44,1 g, 100 mmol) en DMSO (2 l) y después se mezcló con N, N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) (24,8 g, 120 mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (23 g, 200 mmol). La mezcla se agitó durante 18 h a temperatura normal en la oscuridad. Las sustancias no disueltas se filtraron y secaron al vacío para obtener sólidos coloidales. Los sólidos coloidales se lavaron con éter helado tres veces y se secaron para obtener polvos amarillos (53,8 g), que se pueden usar para la siguiente reacción sin purificación adicional.

15 Etapa II: Síntesis de resina peptídica protegida con P10

20 Se midió resina Wang (adquirida de Sigma-Aldrich, 100 g, grado de sustitución: 1,1 mmol/g) y se añadió a una columna de reacción en fase sólida, a continuación, se añadió DMF y se siguió de hinchado con burbujeo de gas nitrógeno durante 30 min. En un matraz de Erlenmeyer separado, se midieron Fmoc-Arg (pbf)-OH (142,7 g, 220 mmol), HOBr (35,6 g, 264 mmol) y DMAP (2,7 g, 22 mmol) y se disolvieron en DMF, y se enfriaron a 0 °C con un baño de agua helada. A continuación, se añadió DIC (40,8 ml, 264 mmol) y se dejó reaccionar durante 5 min. La solución se añadió a la columna de reacción y se hizo reaccionar durante tres horas, y, a continuación, se secó al vacío y se lavó con DMF tres veces.

25 Se disolvieron anhídrido acético (104 ml) y piridina (88,5 ml) en DMF (500 ml), se añadió la mezcla a la resina lavada anterior, y se selló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 h, se lavó con DMF tres veces, se contrajo con metanol y, a continuación, la resina se secó para obtener Fmoc-Arg (pbf)-resina Wang. Se determinó que el grado de sustitución era de 0,53 mmol/g.

30 Se midieron 37,7 g (20 mmol) de Fmoc-Arg (pbf)-resina Wang (grado de sustitución: 0,53 mmol/g) y se añadió a la columna de reacción, se lavó con DMF tres veces y se hinchó con DMF durante 30 min. El grupo de protección Fmoc se eliminó mediante DBLK y, a continuación, se lavó con DMF seis veces. Se midieron Fmoc-Pro-OH (20,2 g, 60 mmol) y HOBr (9,7 g, 72 mmol) y se disolvieron en DMF y se enfriaron a 0 °C con un baño de agua helada. A continuación, se añadió DIC (11,1 ml, 72 mmol) y se dejó reaccionar durante 5 min. La solución se añadió a la columna de reacción y se hizo reaccionar durante dos horas y, a continuación, se añadió DBLK para eliminar el grupo de protección Fmoc.

35 40 Los procedimientos anteriores se repitieron para la adición de cada uno de los aminoácidos desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal en la secuencia peptídica. Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(Bu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Cys(Trt)-OH se conjugaron uno por uno según la secuencia peptídica y, a continuación, se añadió DBLK para eliminar el grupo de protección Fmoc. La solución se lavó con DMF seis veces, se contrajo con metanol dos veces y se secó para obtener resina peptídica protegida con P10 (85,8 g).

45 Etapa III: Síntesis de intermedio de folato-P10 (folato-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)

50 55 Se midió folato-NHS (32,3 g, 60 mmol) y se disolvió en DMSO, se añadió resina peptídica protegida con P10 (85,8 g) obtenida en la etapa II y se hizo reaccionar durante 5 min, se añadió gota a gota DIEA (21 ml, 120 mmol) y se continuó la reacción durante 4 h a temperatura ambiente. El producto de reacción se lavó con DMF tres veces, se contrajo con metanol y se secó al vacío para obtener resina peptídica totalmente protegida (320,3 g).

60 65 La resina peptídica protegida (80 g) obtenida anteriormente se añadió a un matraz de una boca de 1000 ml, la solución de escisión (640 ml, TFA: anisol: EDT: anisol = 90:5:3:2 (relación de volumen)) se preparó previamente, se añadió al matraz y se hizo reaccionar durante 2,5 h a temperatura ambiente. La resina se filtró y se lavó con TFA (100 ml), los filtrados se combinaron y se añadieron a éter absoluto (4500 ml) para separar los sólidos amarillos. Los sólidos se centrifugaron, se lavaron con éter absoluto y se secaron al vacío para obtener sólidos amarillos (40,6 g). El rendimiento del péptido en bruto fue del 97,1 % y la pureza por HPLC fue del 76,3 %. Los sólidos amarillos obtenidos se purificaron mediante HPLC y se liofilizaron para obtener folato-P10 (28,25 g, pureza: 98,6 %).

70 Etapa IV: Síntesis del intermedio R9-P10 (Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)

Se midió una parte de resina peptídica protegida con P10 obtenida en la etapa II y se conjugó según la secuencia peptídica de R9 para obtener el intermedio R9-P10.

Etapa V: Síntesis del intermedio Mc-Val-Cit-PAB-MMAE

5 Se midió MMAE (7,18 g, 10 mmol) y se añadió a un matraz de tres bocas de 250 ml, se disolvió en DMF anhídrio y agitó hasta que fue transparente a temperatura ambiente con protección con N₂. Se añadieron Mc-Val-Cit-PAB-PNP (7,37 g) y HOAt (72 mg, 2 mmol) a la solución y se hicieron reaccionar durante 5 min, y, a continuación, se añadió DIEA (3,5 ml, 20 mmol) gota a gota, la reacción continuó durante 30 min a temperatura ambiente, y, a continuación, la temperatura se aumentó a 40~50 °C y se hizo reaccionar durante 20 h, durante lo cual se usó HPLC para supervisar la reacción. La DMF se eliminó mediante secado al vacío y el producto Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (10,7 g, pureza: 99,3 %) se obtuvo mediante purificación adicional por HPLC.

10 Etapa VI: Síntesis de conjugados LDC10B y LDC10H

15 Se midió Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (6,59 g, 5 mmol) obtenido en la etapa V y se añadió a un matraz de una boca de 5000 ml, se añadieron 3300 ml de tampón de fosfato y se agitó hasta que fue transparente a un pH = 7,2. Se añadió el intermedio folato-P10 o R9-P10 (10,5 g, 5,02 mmol) y se hizo reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente, durante lo cual se usó HPLC para supervisar la reacción. Después de completarse la reacción, la solución se filtró, se obtuvieron LDC10B (14,53 g, pureza: 99,2 %, rendimiento: 85,02 %) y LDC10H (12,37 g, pureza: 98,7 %, rendimiento: 81,34 %) mediante HPLC y se liofilizó.

20 Los conjugados, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC11H y LDC12H se pueden obtener mediante procedimientos similares.

25 Etapa VII: Síntesis de folato-FITC (FITC-ACP-Lys (folato)-OH)

30 Se midió resina Wang (1 g, grado de sustitución: 1,1 mmol/g) y se añadió a una columna de reacción en fase sólida, a continuación, se añadió DMF y se siguió de hinchado con burbujeo de gas nitrógeno durante 30 min. En un matraz de Erlenmeyer separado, se midieron 2 equivalentes molares (eq.) de Fmoc-Lys(Dde)-OH y 2,4 eq. de HOBT y 0,2 eq. de DMAP y se disolvieron en DMF y se enfriaron a 0 °C con un baño de agua helada. A continuación, se añadieron 2,4 eq. de DIC y se dejaron reaccionar durante 5 min. La solución se añadió a la columna de reacción y se hizo reaccionar durante tres horas y, a continuación, se secó al vacío y se lavó con DMF tres veces.

35 Se disolvieron 10 eq. de cada uno de anhídrido acético y piridina en DMF (10 ml), se añadió la mezcla a la resina lavada anterior, y se selló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 h, se lavó con DMF tres veces, se contrajo con metanol y, a continuación, la resina se secó para obtener Fmoc-LYS(Dde)-resina Wang. Se determinó que el grado de sustitución era de 0,51 mmol/g.

40 Se midieron 1,3 g de Fmoc-LYS(Dde)-resina Wang (grado de sustitución: 0,51 mmol/g) y se añadió a la columna de reacción, se lavó con DMF tres veces y se hinchó con DMF durante 30 min. El grupo de protección Fmoc se eliminó mediante DBLK y, a continuación, se lavó con DMF seis veces. Se midieron 2 eq. de Fmoc-6-ACP-OH y 2,4 eq. de HOBT y se disolvieron en DMF, y se enfriaron a 0 °C con un baño de agua helada. A continuación, se añadieron 2,4 eq. de DIC y se dejó reaccionar durante 5 min. La solución se añadió a la columna de reacción y se hizo reaccionar durante dos horas y, a continuación, se añadió DBLK para eliminar el grupo de protección Fmoc.

45 Se añadieron 1,5 eq. de FITC en DMF a la resina y se siguió de la adición gota a gota de 3 eq. de DIEA. La reacción prosiguió durante 2 h y la resina se lavó tres veces con DMF.

50 Se añadió hidrato de hidracina al 2 % en DMF a la resina anterior y se dejó reaccionar durante 15 min. Se repitió dos veces y, a continuación, se lavó seis veces con DMF.

55 Se midió folato-NHS (2 eq.) y se disolvió en DMSO, se añadió a la resina y se hizo reaccionar durante 5 minutos, se añadió gota a gota DIEA (21 ml, 120 mmol) y se continuó la reacción durante 4 h a temperatura ambiente. El producto de reacción se lavó con DMSO y DMF tres veces, respectivamente, se contrajo con metanol y se secó al vacío para obtener resina peptídica totalmente protegida.

60 Después de la desprotección y escisión de la resina, el folato-FITC en bruto se purificó mediante HPLC para obtener un producto en forma sólida amarilla con una pureza del 95 %. La estructura de folato-FITC se muestra en la fig. 3.

65 Etapa VIII: Síntesis de 10A-FITC

66 Se midieron 0,1 mmol de resina peptídica protegida con P10 (0,43 g) de la etapa II y se añadieron a una columna de reacción en fase sólida, a continuación, se añadió DMF y se siguió de hinchado con burbujeo de gas nitrógeno durante 30 minutos. Se añadieron 2 eq. de Fmoc-e-ACP-OH y, a continuación, 2 eq. de DBLK para eliminar el grupo de protección Fmoc. La solución se lavó con DMF seis veces.

Se añadieron 1,5 eq. de FITC en DMF a la resina y se siguió de la adición gota a gota de 3 eq. de DIEA. La reacción prosiguió durante 2 h y la resina se lavó tres veces con DMF.

5 Después de la desprotección y escisión de la resina, se purificó 10A-FITC en bruto mediante HPLC para obtener una forma sólida amarilla del producto con una pureza del 95 %. La estructura de 10A-FITC se ha mostrado en la fig. 3.

Etapa IX: Síntesis de 10B-FITC

10 Se midieron 0,1 mmol de resina peptídica protegida con P10 (0,43 g) de la etapa II y se añadieron a una columna de reacción en fase sólida, a continuación, se añadió DMF y se siguió de hinchado con burbujeo de gas nitrógeno durante 30 min. Se añadieron 2 eq. de Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-e-ACP-OH y, a continuación, 2 eq. de DBLK para eliminar el grupo de protección Fmoc. La solución se lavó con DMF seis veces.

15 Se añadieron 1,5 eq. de FITC en DMF a la resina y se siguió de la adición gota a gota de 3 eq. de DIEA. La reacción prosiguió durante 2 h y la resina se lavó tres veces con DMF.

Se añadió hidrato de hidracina al 2 % en DMF a la resina anterior y se dejó reaccionar durante 15 min. Se repitió dos veces y, a continuación, se lavó seis veces con DMF.

20 Se midió folato-NHS (2 eq.) y se disolvió en DMSO, se añadió a la resina y se hizo reaccionar durante 5 minutos, se añadió gota a gota DIEA (21 ml, 120 mmol) y se continuó la reacción durante 4 h a temperatura ambiente. El producto de reacción se lavó con DMSO y DMF tres veces, respectivamente, se contrajo con metanol y se secó al vacío para obtener resina peptídica totalmente protegida.

25 Después de la desprotección y escisión de la resina, se purificó 10B-FITC en bruto mediante HPLC para obtener una forma sólida amarilla del producto con una pureza del 95 %. La estructura de 10B-FITC se ha mostrado en la fig. 3.

Etapa X: Síntesis de LDC10B-CY5

30 Se midieron 0,1 mmol de resina peptídica protegida con P10 (0,43 g) de la etapa II y se añadieron a una columna de reacción en fase sólida, a continuación, se añadió DMF y se siguió de hinchado con burbujeo de gas nitrógeno durante 30 minutos. Se añadieron 2 eq. de Fmoc-Lys(Dde)-OH y, a continuación, 2 eq. de DBLK para eliminar el grupo de protección Fmoc. La solución se lavó con DMF seis veces.

35 Se añadieron a la resina 100 mg de colorante de fluorescencia Cy5, 1,5 eq de HATU y 1,5 eq de HOBT en DMF, seguido de la adición gota a gota de 3 eq. de DIEA. La reacción prosiguió durante 2 h y la resina se lavó tres veces con DMF.

40 Se añadió hidrato de hidracina al 2 % en DMF a la resina anterior y se dejó reaccionar durante 15 min. Se repitió dos veces y, a continuación, se lavó seis veces con DMF.

45 Se midió folato-NHS (2 eq.) y se disolvió en DMSO, se añadió a la resina y se hizo reaccionar durante 5 minutos, se añadió gota a gota DIEA (21 ml, 120 mmol) y se continuó la reacción durante 4 h a temperatura ambiente. El producto de reacción se lavó con DMSO y DMF tres veces, respectivamente, se contrajo con metanol y se secó al vacío para obtener resina peptídica totalmente protegida.

50 Después de la desprotección y escisión de la resina, se purificó LDC10B-CY5 en bruto mediante HPLC para obtener una forma sólida amarilla del producto con una pureza del 95 %. LDC10B-CY5 es una versión de LDC10B marcada con sonda de fluorescencia CY5, donde el resto bilingando se conjuga con el colorante CY5 a través de un espaciador de lisina.

EJEMPLO II: Ensayos de eficacia de conjugados

55 Los conjugados implicados son los siguientes: LDC10B, LDC10BX, LDC10BR, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC13H, LDC1, LDC10A, LDC11A y LDC13A. LDC1, LDC10A, LDC11A y LDC13A se usan como controles en algunos experimentos y sus estructuras son las siguientes.

LDC1: Folato-(PEG)₃-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

60 LDC10A: P10-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

LDC11A: P11-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

65 LDC13A: P13-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

1. Prueba de endocitosis del conjugado LDC10B

Los conjugados implicados son los siguientes: Folato-FITC (FITC-ACP-Lys (Folato)-OH), 10B-FITC y 10A-FITC.

5 Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico

Métodos experimentales:

10 1) Se incubaron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375, célula de cáncer de pulmón humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

15 2) Se sembraron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375, célula de cáncer de pulmón humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954 en placas a 1 x 10³ células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

20 3) Se añadió 1 µM) de conjugados de FITC o de control a las células en la placa y se incubaron durante 10-15 min a 37 °C. El medio de cultivo de los pocillos se eliminó, a continuación, mediante aspiración y las células se lavaron con PBS tres veces.

25 4) A continuación, se obtuvieron imágenes de las células con un microscopio confocal (marca) para visualizar la endocitosis.

Resultados y análisis:

25 Para demostrar que la adición de un ligando de folato puede conferir endocitosis mediada por el receptor de folato al bilingando LDC10B, se probaron KB (célula positiva para receptor de folato) y A375 (célula negativa para receptor de folato) con 10A-FITC, folato-FITC y 10B-FITC. Como se muestra en la fig. 2, El folato-FITC entra en KB (célula positiva para receptor de folato) pero no en A375 (célula negativa para receptor de folato) (paneles A y B) a través de la endocitosis mediada por el receptor de folato, mientras que 10A-FITC no puede entrar en ninguna de las células (paneles C y D) debido a la falta de endocitosis. Sin embargo, la adición de ligando de folato que convierte 10A-FITC en un conjugado de bi-ligando, es decir, 10B-FITC confirió al conjugado la capacidad de entrar en KB (panel E) pero no en A375 (panel F) a través de endocitosis mediada por el receptor de folato. Asimismo, la preincubación de células KB con folato libre 50 mM (exceso de 50 veces de conjugado) bloqueó completamente la endocitosis tanto de folato-FITC como de 10B-FITC (datos no mostrados), la confirmación de la endocitosis estuvo de hecho mediada por el receptor de folato.

2. Prueba de citotoxicidad del conjugado LDC10B

40 Muestra de prueba: LDC10B

Muestras de control: MMAE, LDC1, LDC10A

Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico

Métodos experimentales:

45 1) Se incubaron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375, célula de cáncer de pulmón humano H1299, línea celular de leucemia mieloide crónica K562, célula de cáncer de pulmón humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954, célula de cáncer gástrico humano N87 y célula de cáncer de mama humano SK-BR-3 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

50 2) Se sembraron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375, célula de cáncer de pulmón humano H1299, línea celular de leucemia mieloide crónica K562, célula de cáncer de pulmón humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954, célula de cáncer gástrico humano N87 y célula de cáncer de mama humano SK-BR-3 en placas a 1 x 10³ células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

60 3) Se prepararon soluciones de reserva de conjugados LDC o controles en solución de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugados LDC o controles diluidos en serie a las células de prueba en las placas y se incubaron durante 15-30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de cultivo de los pocillos se retiró a continuación por aspiración y las células de prueba se incubaron en medio de cultivo nuevo sin conjugados (150 µl/pocillo) durante 2-3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %.

65 4) Se añadió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo para medir la cantidad de células muertas y cada placa se incubó en una incubadora durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

5) Se leyó cada placa a 490 nm en un lector de microplacas y se compararon las supervivencias de las células para las células de prueba con o sin el tratamiento de conjugados de LDC. Se determinaron las concentraciones farmacológicas de LDC que son necesarias para un 50 % de muerte celular (valores de Cl_{50}).

5 Resultados y análisis:

LDC10B puede destruir las siguientes células cancerosas de manera muy eficiente: línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, celular de cáncer de pulmón humano H460, celular de cáncer de pulmón humano H1299, línea celular de leucemia mieloide crónica K562, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954, célula de cáncer gástrico humano N87, célula de cáncer de mama humano SK-BR-3 y los valores de Cl_{50} de LDC10B fueron menores (más fuertes) que los de los controles de LDC1 y LDC10A (véase tabla 4). Se sabe que estas líneas celulares tienen expresión de receptor de folato y/o receptor TRPV6. Sin embargo, la citotoxicidad de LDC10B es significativamente menor (lecturas de Cl_{50} mayores) para la línea celular de melanoma A375 que carece de expresión del receptor de folato.

LDC10B es un conjugado farmacológico biligando que puede unirse tanto al receptor de folato como al receptor TRPV6. Para líneas celulares positivas para el receptor, puede verse en la tabla 5 que la citotoxicidad de LDC10B fue 2-15 veces más fuerte (el valor de Cl_{50} fue 2-15 veces menor) que el conjugado farmacológico de un único ligando LDC1 o LDC10A. Para la línea celular de melanoma A375 que carece de receptor de folato, LDC10B, similar a LDC1 y LDC10A, es aproximadamente 15 veces menos tóxico, lo que indica una buena especificidad. Por lo tanto, el conjugado farmacológico biligando LDC10B muestra efectos sinérgicos y contribuye a la eficacia de los fármacos.

Tabla 4: Resultados de la prueba de citotoxicidad (valores de Cl_{50}) del conjugado LDC10B frente a los controles

(Unidad: mol/l, M)							
TABLA 4A: Tiempo de incubación 30 min							
CÉLULA	H1299	K562	H460	SKOV3	HCC1954	N87	SK-BR-3
MMAE	$0,86 \times 10^{-9}$	$0,54 \times 10^{-9}$	$0,77 \times 10^{-9}$	$0,62 \times 10^{-9}$	$0,45 \times 10^{-9}$	$0,68 \times 10^{-9}$	$0,52 \times 10^{-9}$
LDC1	$2,62 \times 10^{-7}$	$9,31 \times 10^{-8}$	$1,92 \times 10^{-7}$	$1,02 \times 10^{-7}$	$9,44 \times 10^{-8}$	$2,39 \times 10^{-7}$	$9,82 \times 10^{-8}$
LDC10A	$5,09 \times 10^{-7}$	$1,11 \times 10^{-7}$	$4,83 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-7}$	$1,06 \times 10^{-7}$	$5,17 \times 10^{-7}$	$1,09 \times 10^{-7}$
LDC10B	$5,88 \times 10^{-8}$	$1,48 \times 10^{-8}$	$5,04 \times 10^{-8}$	$1,57 \times 10^{-8}$	$1,41 \times 10^{-8}$	$7,51 \times 10^{-8}$	$1,59 \times 10^{-8}$
Tabla 4B: Tiempo de incubación 15 min							
CÉLULA	A375	KB					
MMAE	1×10^{-7}	$8,9 \times 10^{-8}$					
LDC1	1×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-5}$					
LDC10A	1×10^{-5}	$8,5 \times 10^{-6}$					
LDC10B	1×10^{-5}	$7,6 \times 10^{-7}$					

25 3. Prueba de citotoxicidad del conjugado LDC11B

Muestra de prueba: LDC11B

Muestras de control: MMAE, LDC1, LDC11A

Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico

30 Métodos experimentales:

1) Se incubaron célula de cáncer de pulmón humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, célula de riñón embrionario humano 293A a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

35 2) Se sembraron célula de cáncer de pulmón humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, célula de riñón embrionario humano 293A en placas a 1×10^3 células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

40 3) Se prepararon soluciones de reserva de conjugados LDC o controles en solución de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugados LDC o control diluidos en serie a las células en la placa y se incubaron durante 15-30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de cultivo de los pocillos se retiró a continuación por aspiración y las células se incubaron en medio de cultivo nuevo sin conjugados (150 µl/pocillo) durante 2-3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %.

4) Se añadió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo para medir la cantidad de células muertas y la placa se incubó en una incubadora durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

5) Se leyó la placa a 490 nm en un lector de microplacas y se compararon las supervivencias de las células para las células con o sin el tratamiento de conjugados de LDC. Se determinaron las concentraciones farmacológicas de LDC que son necesarias para un 50 % de muerte celular (valores de Cl₅₀).

Resultados y análisis:

10 LDC11B puede destruir las siguientes células cancerosas o inhibir su crecimiento: celular de cáncer de pulmón humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, célula de riñón embrionario humano 293A. Se sabe que estas líneas celulares tienen alto nivel expresión de receptor de folato y/o receptor de LHRH. Los valores de Cl₅₀ de LDC11B fueron menores que los de los controles LDC1 y LDC11A (véase tabla 5).

15 LDC11B es un conjugado farmacológico biligando que puede unirse tanto al receptor de folato como al receptor de LHRH. Puede verse en la tabla 5 que la citotoxicidad de LDC11B fue casi diez veces más fuerte (el valor de Cl₅₀ fue casi diez veces menor) que el conjugado de un único ligando LDC1 o LDC11A. Por lo tanto, el conjugado farmacológico biligando LDC11B muestra efectos sinérgicos y contribuye a la eficacia de los fármacos.

20 Tabla 5: Resultados de la prueba de citotoxicidad (valores de Cl₅₀) del conjugado LDC11B frente a los controles

(Unidad: mol/l, M)			
CÉLULA	H460	SKOV3	293A
MMAE	0,58 x 10 ⁻⁹	0,44 x 10 ⁻⁹	0,86 x 10 ⁻⁹
LDC1	5,26 x 10 ⁻⁷	2,95 x 10 ⁻⁷	7,15 x 10 ⁻⁷
LDC11A	6,67 x 10 ⁻⁷	3,41 x 10 ⁻⁷	1,31 x 10 ⁻⁶
LDC11B	8,13 x 10 ⁻⁸	4,38 x 10 ⁻⁸	5,24 x 10 ⁻⁷

4. Prueba de citotoxicidad del conjugado LDC12B

25 Muestra de prueba: LDC12B

Muestra de control: MMAE

Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico

Métodos experimentales:

30 1) Se incubaron célula de cáncer de endometrio humano HEC-1A, línea celular de cáncer gástrico humano GTL-16, carcinoma de colon humano HCT-116, línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

35 2) Se sembraron célula de cáncer de endometrio humano HEC-1A, línea celular de cáncer gástrico humano GTL-16, carcinoma de colon humano HCT-116, línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y en placas a 1 x 10³ células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

40 3) Se prepararon soluciones de reserva de conjugados LDC o controles en solución de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugados LDC o control diluidos en serie a las células en la placa y se incubaron durante 15-30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de cultivo de los pocillos se retiró a continuación por aspiración y las células se incubaron en medio de cultivo nuevo sin conjugados (150 µl/pocillo) durante 2-3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %.

45 4) Se añadió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo para medir la cantidad de células muertas y la placa se incubó en una incubadora durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

50 5) Se leyó la placa a 490 nm en un lector de microplacas y se compararon las supervivencias de las células para las células con o sin el tratamiento de conjugados de LDC. Se determinaron las concentraciones farmacológicas de LDC que son necesarias para un 50 % de muerte celular (valores de Cl₅₀).

Resultados y análisis:

55 LDC12B puede destruir las siguientes células cancerosas o inhibir su crecimiento: célula de cáncer de endometrio humano HEC-1A, línea celular de cáncer gástrico humano GTL-16, carcinoma de colon humano HCT-116, línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Los valores de Cl₅₀ se mostraron en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados de la prueba de citotoxicidad (valores de IC_{50}) del conjugado LDC12B frente a MMAE

(Unidad: mol/l, M)				
CÉLULA	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	SH-SY5Y
MMAE	$1,27 \times 10^{-8}$	$6,38 \times 10^{-9}$	$8,74 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-8}$
LDC12B	$8,26 \times 10^{-7}$	$6,12 \times 10^{-7}$	$6,31 \times 10^{-7}$	$3,96 \times 10^{-7}$

5. Prueba de citotoxicidad del conjugado LDC13B

- 5 Muestra de prueba: LDC13B
 Muestras de control: MMAE, LDC1, LDC13A
 Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico
 Métodos experimentales:
- 10 1) Se incubaron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, carcinoma de colon humano HCT-116, célula de cáncer de próstata humana PC-3, línea celular de cáncer gástrico humano GTL-16, célula de cáncer de endometrio humano HEC-1A y célula de cáncer gástrico humano N87 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.
- 15 2) Se sembraron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, carcinoma de colon humano HCT-116, célula de cáncer de próstata humana PC-3, línea celular de cáncer gástrico humano GTL-16, célula de cáncer de endometrio humano HEC-1A y célula de cáncer gástrico humano N87 en placas a 1×10^3 células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incuban durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.
- 20 3) Se prepararon soluciones de reserva de conjugados LDC o controles en solución de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugados LDC o control diluidos en serie a las células en la placa y se incubaron durante 15-30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de cultivo de los pocillos se retiró a continuación por aspiración y las células se incubaron en medio de cultivo nuevo sin conjugados (150 µl/pocillo) durante 2-3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %.
- 25 4) Se añadió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo para medir la cantidad de células muertas y la placa se incubó en una incubadora durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.
- 30 5) Se leyó la placa a 490 nm en un lector de microplacas y se compararon las supervivencias de las células para las células con o sin el tratamiento de conjugados de LDC. Se determinaron las concentraciones farmacológicas de LDC que son necesarias para un 50 % de muerte celular (valores de IC_{50}).

Resultados y análisis:

- 35 LDC13B puede destruir las siguientes células cancerosas o inhibir su crecimiento: línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, célula de cáncer de colon humano HCT-116, línea celular de cáncer gástrico humano GTL-16, célula de cáncer de endometrio humano HEC-1A, célula de cáncer de próstata humana PC-3, cáncer de estómago humano N87. En particular, LDC13B es muy potente para KB, que es una línea celular con receptores tanto de folato como de LHRH. Asimismo, el biligando LDC13B es 2-10 veces más potente que cualquiera de los conjugados farmacológicos de un único ligando, es decir, LDC1 y LDC13A, lo que confirma la ventaja del conjugado farmacológico biligando en cuanto a eficacia. Los valores de IC_{50} se mostraron en la tabla 7.

Tabla 7: Resultados de la prueba de citotoxicidad (valores de IC_{50}) del conjugado LDC13B frente a los controles

(Unidad: mol/l, M)						
CÉLULA	KB	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	PC-3	N87
MMAE	$2,88 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-8}$	$6,38 \times 10^{-9}$	$8,74 \times 10^{-9}$	$1,28 \times 10^{-8}$	$3,83 \times 10^{-9}$
LDC1	$6,5 \times 10^{-8}$	-	-	-	-	-
LDC13A	$4,5 \times 10^{-6}$	-	-	-	-	-
LDC13B	$2,57 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^{-6}$	$7,55 \times 10^{-7}$	$9,4 \times 10^{-7}$	$1,18 \times 10^{-6}$	$3,26 \times 10^{-7}$

6. Prueba de citotoxicidad del conjugado LDC10H

- 45 Muestra de prueba: LDC10H
 Muestras de control: MMAE, LDC1, LDC10A
 Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico
 Métodos experimentales:

1) Se incubaron célula de cáncer de pulmón humano H1299, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954 y célula de cáncer de pulmón humano H460 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

5 2) Se sembraron célula de cáncer de pulmón humano H1299, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954 y célula de cáncer de pulmón humano H460 en placas a 1 x 10³ células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

10 3) Se prepararon soluciones de reserva de conjugados LDC o controles en solución de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugados LDC o control diluidos en serie a las células en la placa y se incubaron durante 15-30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de cultivo de los pocillos se retiró a continuación por aspiración y las células se incubaron en medio de cultivo nuevo sin conjugados (150 µl/pocillo) durante 2-3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %.

15 4) Se añadió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo para medir la cantidad de células muertas y la placa se incubó en una incubadora durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

20 5) Se leyó la placa a 490 nm en un lector de microplacas y se compararon las supervivencias de las células para las células con o sin el tratamiento de conjugados de LDC. Se determinaron las concentraciones farmacológicas de LDC que son necesarias para un 50 % de muerte celular (valores de Cl₅₀).

Resultados y análisis:

25 LDC10H puede destruir las siguientes células o inhibir su crecimiento: célula de cáncer de pulmón humano H1299, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954 y célula de cáncer de pulmón humano H460. El bilingando LDC10H es 10 veces más potente que el conjugado de fármaco monolíngando LDC10A, lo que indica que la secuencia de péptido de penetración de membrana (H) puede ayudar con el suministro del fármaco a las células por endocitosis. Asimismo, LDC10H también es más potente que el conjugado LDC1 de un solo ligando, lo que confirma la ventaja del conjugado farmacológico bilingando en cuanto a eficacia. Los valores de Cl₅₀ de LDC10H fueron menores que los controles LDC1 y LDC10A (véase tabla 8).

Tabla 8: Resultados de la prueba de citotoxicidad (valores de Cl₅₀) del conjugado LDC10H frente a los controles

(Unidad: mol/l, M)				
CÉLULA	HCC1954	H1299	SKOV3	H460
MMAE	0,29 x 10 ⁻⁹	0,71 x 10 ⁻⁹	0,49 x 10 ⁻⁹	0,56 x 10 ⁻⁹
LDC1	7,79 x 10 ⁻⁸	1,86 x 10 ⁻⁷	2,01 x 10 ⁻⁷	1,37 x 10 ⁻⁷
LDC10A	4,18 x 10 ⁻⁷	7,88 x 10 ⁻⁷	6,41 x 10 ⁻⁷	7,24 x 10 ⁻⁷
LDC10H	3,6 x 10 ⁻⁸	9,04 x 10 ⁻⁸	7,38 x 10 ⁻⁸	8,53 x 10 ⁻⁸

7. Prueba de citotoxicidad del conjugado LDC1013

35 Muestras de control: MMAE, LDC1, LDC10A
Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico
Métodos experimentales:

40 1) Se incubaron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375 y célula de cáncer de pulmón humano H460 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

45 2) Se sembraron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375 y célula de cáncer de pulmón humano H460 en placas a 1 x 10³ células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

50 3) Se prepararon soluciones de reserva de conjugados LDC o controles en solución de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugados LDC o control diluidos en serie a las células en la placa y se incubaron durante 15-30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de cultivo de los pocillos se retiró a continuación por aspiración y las células se incubaron en medio de cultivo nuevo sin conjugados (150 µl/pocillo) durante 2-3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %.

55 4) Se añadió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo para medir la cantidad de células muertas y la placa se incubó en una incubadora durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

5) Se leyó la placa a 490 nm en un lector de microplacas y se compararon las supervivencias de las células para las células con o sin el tratamiento de conjugados de LDC. Se determinaron las concentraciones farmacológicas de LDC que son necesarias para un 50 % de muerte celular (valores de Cl_{50}).

5 Resultados y análisis:

10 LDC1013 es eficaz para destruir las siguientes líneas celulares, línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, célula de cáncer de pulmón humano H460, e inhibir el crecimiento de la línea celular de melanoma A375 y los valores de Cl_{50} de LDC1013 fueron menores (más fuertes) que los de los controles LDC1 y LDC10A (véase tabla 9). Sin embargo, la citotoxicidad de LDC1013 es significativamente menor (lecturas de Cl_{50} mayores) para la línea celular de control línea celular de melanoma A375.

15 LDC1013 es un conjugado farmacológico biligando que puede unirse tanto al receptor de LHRH como al receptor TRPV6. Para líneas celulares positivas para el receptor, puede verse en la tabla 9 que la citotoxicidad de LDC1013 fue 2-15 veces más fuerte (el valor de Cl_{50} fue 2-15 veces menor) que el conjugado farmacológico de un único ligando LDC1 o LDC10A. Para A375, LDC 1013 es aproximadamente 10-100 veces menos tóxico que para H460 y KB, respectivamente, lo que indica una buena especificidad. Por lo tanto, el conjugado farmacológico biligando LDC1013 muestra efectos sinérgicos y contribuye a la eficacia de los fármacos.

20 Tabla 9: Resultados de la prueba de citotoxicidad (valores de Cl_{50}) del conjugado LDC1013 frente a los controles

(Unidad: mol/l, M)				
	MMAE	FA-MMAE	LDC10A	LDC1013
KB	2×10^{-8}	4×10^{-6}	$5,8 \times 10^{-6}$ M	$1,3 \times 10^{-7}$
H460	$3,7 \times 10^{-8}$	$9,4 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^{-5}$ M	$2,2 \times 10^{-6}$
A375	$8,5 \times 10^{-8}$	$3,7 \times 10^{-5}$	$3,94 \times 10^{-5}$ M	$1,19 \times 10^{-5}$

8. Prueba de citotoxicidad del conjugado LDC10BR

25 Muestras de control: MMAE y LDC10B

Medio de cultivo: medio RPMI 1640, sin ácido fólico

Métodos experimentales:

30 1) Se incubaron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375 y célula de cáncer de pulmón humano H460 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

35 2) Se sembraron línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, línea celular de melanoma A375 y célula de cáncer de pulmón humano H460 en placas a 1×10^3 células por pocillo (placa de 96 pocillos) y se incubaron durante 8-12 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

40 3) Se prepararon soluciones de reserva de conjugados LDC o controles en solución de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de conjugados LDC o control diluidos en serie a las células en la placa y se incubaron durante 15-30 min a 37 °C, CO₂ al 5 %. El medio de cultivo de los pocillos se retiró a continuación por aspiración y las células se incubaron en medio de cultivo nuevo sin conjugados (150 µl/pocillo) durante 2-3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %.

45 4) Se añadió el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo para medir la cantidad de células muertas y la placa se incubó en una incubadora durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

50 5) Se leyó la placa a 490 nm en un lector de microplacas y se compararon las supervivencias de las células para las células con o sin el tratamiento de conjugados de LDC. Se determinaron las concentraciones farmacológicas de LDC que son necesarias para un 50 % de muerte celular (valores de Cl_{50}).

Resultados y análisis:

55 LDC10BR es eficaz para destruir las siguientes líneas celulares, línea celular de cáncer de nasofaringe humano KB, célula de cáncer de pulmón humano H460 e inhibir el crecimiento de la línea celular de melanoma A375 y los valores de Cl_{50} de LDC10BR fueron comparables a los del conjugado biligando LDC10B (véase tabla 10).

55 LDC10BR es un conjugado farmacológico triligando que puede unirse al receptor de RGD (integrina alfa), receptor de folato y receptor TRPV6. Para líneas celulares positivas para el receptor, puede verse en la tabla 10 que la citotoxicidad de LDC10BR era comparable a la del conjugado biligando LDC10B. Por lo tanto, el conjugado farmacológico triligando LDC10BR es al menos tan eficaz como el biligando LDC10B. Asimismo, un triligando LDC puede tener una

citotoxicidad y selectividad superiores hacia las células cancerosas con expresión de los tres receptores, mostrando los tres ligandos efectos sinérgicos y contribuir a la eficacia de los fármacos.

Tabla 10: Resultados de la prueba de citotoxicidad (valores de IC_{50}) del conjugado LDC10BR frente a LDC10B

(Unidad: mol/l, M)			
	MMAE	LDC10B	LDC10BR
KB	2×10^{-8}	$2,2 \times 10^{-6}$	$6,6 \times 10^{-6}$
H460	$3,7 \times 10^{-8}$	$6,8 \times 10^{-6}$	$6,4 \times 10^{-6}$
A375	$8,5 \times 10^{-8}$	$5,13 \times 10^{-5}$	$3,81 \times 10^{-5}$

5

EJEMPLO III: Estudio de eficacia de conjugados en modelos animales

Objetivo: explorar la eficacia antitumoral de conjugados en modelos de ratones para el tratamiento de cánceres.

10 1. Ensayo inhibidor de conjugados LDC10B y LDC10H contra tumores de xenoinjerto

Conjugados usados para el tratamiento: LDC10B, LDC10H

Animal: ratones desnudos, de 6-8 semanas de edad, hembras

Métodos experimentales:

15

1) Se incubaron celular de cáncer de pulmón de células grandes humano H460, célula de cáncer de pulmón humano A549, célula de cáncer de ovario SKOV3 y línea celular de cáncer de mama HCC1954 a 37°C , CO_2 al 5 % en medio IMDM que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

20

2) Generación de tumores: se inyectaron 7×10^6 células tumorales por vía subcutánea en la espalda de ratones desnudos y los ratones se agruparon para el tratamiento después de que los tamaños de los tumores fueran tan grandes como aproximadamente $100-200 \text{ mm}^3$.

25

3) Tratamiento: 3 ratones/grupo, tratados con LDC10B, LDC10H, así como controles MMAE y PBS con dosis de 5 y 10 mg/kg cada 5 días, tres inyecciones.

4) Se supervisaron el rendimiento físico, los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los animales. El número de animales muertos se registró durante el experimento.

30

Resultados y análisis:

LDC10B y LDC10H pueden inhibir el crecimiento tumoral de célula de cáncer de pulmón de células grandes humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3 y línea celular de cáncer de mama HCC1954, la mayoría de los tumores desaparecieron después de tres inyecciones a dosis de 5 y 10 mg/kg. Los resultados detallados se mostraron en la tabla 11 y la tabla 12.

Tabla 11: Eficacia inhibidora del conjugado LDC10B contra tumores de xenoinjerto

Tiempo	Tumor H460 trasplantado				Tumor trasplantado HCC1954		Tumor trasplantado SKOV3	
	5 mg/kg		10 mg/kg		10 mg/kg		10 mg/kg	
	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm^3)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm^3)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm^3)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm^3)
Antes de la inyección	23,13	89,25	22,51	97,38	21,85	225,32	22,96	178,68
Cinco días después de la inyección 1	22,53	78,63	22,53	45,74	22,2	108,73	22,44	163,05

(continuación)

Tiempo	Tumor H460 trasplantado				Tumor HCC1954 trasplantado		Tumor SKOV3 trasplantado	
	5 mg/kg		10 mg/kg		10 mg/kg		10 mg/kg	
	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)
Cinco días después de la inyección 2	22,26	49,11	23,37	6,32	22,55	0	23,23	120,51
Cinco días después de la inyección 3	21,65	52,5	23	0	22,38	0	23,53	68,31

Tabla 12: Eficacia inhibidora del conjugado LDC10H contra tumores de xenoinjerto

LDC10H	Tumor H460 trasplantado				Tumor HCC1954 trasplantado		
	5 mg/kg		10 mg/kg		10 mg/kg		
	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	
Antes de la inyección	23,29	136,49	23,37	126	22,05	88,6	
Cinco días después de la inyección 1	24,26	71,51	24,39	108,15	23,32	16,77	
Cinco días después de la inyección 2	23,14	65,73	22,12	37,5	22,87	0	
Cinco días después de la inyección 3	23,22	11,64	23,61	2,34	22,51	0	

5 2. Ensayo inhibidor de conjugados LDC11A, LDC11B contra tumores de xenoinjerto

Conjugados usados para el tratamiento: LDC11A y LDC11B

Animal: ratones desnudos, de 6-8 semanas de edad, hembras

Métodos experimentales:

- 10 1) Se incubaron célula de cáncer de pulmón de células grandes humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3, línea celular de cáncer de mama HCC1954 y célula de cáncer de mama humano SK-BR-3 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio IMDM que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.
- 15 2) Generación de tumores: se inyectaron 7 x 10⁶ células tumorales por vía subcutánea en la espalda de ratones desnudos y los ratones se agruparon para el tratamiento después de que los tamaños de los tumores fueran tan grandes como aproximadamente 100~200 mm³.
- 20 3) Tratamiento: 3 ratones/grupo, tratados con LDC11A, LDC11B, así como controles MMAE y PBS con dosis de 5 y 10 mg/kg cada 5 días, tres inyecciones.
- 4) Se supervisaron el rendimiento físico, los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los animales. El número de animales muertos se registró durante el experimento.

25 Resultados y análisis:

LDC11B puede inhibir el crecimiento tumoral de célula de cáncer de pulmón de células grandes humano H460, célula de cáncer de ovario SKOV3 y línea celular de cáncer de mama HCC1954, la mayoría de los tumores desaparecieron

después de tres inyecciones continuas a la dosis de 10 mg/kg. Mientras que, con respecto a LDC11A, los animales murieron después de la primera inyección debido a la fuerte toxicidad. Los resultados detallados se mostraron en la tabla 13 y la tabla 14.

5

Tabla 13: Eficacia inhibidora del conjugado LDC11B contra tumores de xenoinjerto

Tiempo	Tumor H460 trasplantado		Tumor SKOV3 trasplantado		Tumor HCC1954 trasplantado	
	10 mg/kg		10 mg/kg		10 mg/kg	
	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)
Antes de la inyección	21,85	225,32	22,11	169,22	22,76	218,76
Cinco días después de la inyección 1	22,2	108,73	24,28	137,66	22,56	87,51
Cinco días después de la inyección 2	22,55	0	23,6	76,13	23,15	0
Cinco días después de la inyección 3	22,38	0	24,92	27,84	23,48	0

Tabla 14. Eficacia inhibidora del conjugado LDC11A contra tumores de xenoinjerto

LDC11A	Tumor H460 trasplantado	
	10 mg/kg	
	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)
Antes de la inyección	24,46	294
Tres días después de la inyección 1	18,25	300
Cinco días después de la inyección 1	Muerte	Muerte

3. Ensayo inhibidor de conjugados LDC13B contra tumores de xenoinjerto

10

Conjugados usados para el tratamiento: LDC13B

Animal: ratones desnudos, de 6-8 semanas de edad, hembras

Métodos experimentales:

15

1) Se incubaron células de cáncer de pulmón de células grandes humano H460 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio IMDM que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.

20

2) Generación de tumores: se inyectaron 7 x 10⁶ células tumorales por vía subcutánea en la espalda de ratones desnudos y los ratones se agruparon para el tratamiento después de que los tamaños de los tumores fueran tan grandes como aproximadamente 200 mm³.

25

3) Tratamiento: 3 ratones/grupo, tratados con LDC13B así como controles MMAE y PBS con dosis de 2,5 y 5 mg/kg cada 3 días, cuatro inyecciones.

25

4) Se supervisaron el rendimiento físico, los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los animales. El número de animales muertos se registró durante el experimento.

Resultados y análisis:

30

LDC13B puede inhibir el crecimiento tumoral de célula de cáncer de pulmón de células grandes humano H460, la mayoría de los tumores se contrajeron rápidamente a dosis de 2,5 mg/kg y desaparecieron por completo después de cuatro inyecciones a dosis de 5 mg/kg. Los resultados detallados se mostraron en la tabla 15.

Tabla 15. Eficacia inhibidora del conjugado LDC13B contra tumor de xenoinjerto

Tiempo	Tumor H460 trasplantado			
	2,5 mg/kg		5 mg/kg	
	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)
Antes de la inyección	22,7	294	20,95	196
3 días después de la inyección 1	22,73	384	18,36	144
3 días después de la inyección 2	22,65	384	19,65	40
3 días después de la inyección 3	22,47	144	18,21	18
3 días después de la inyección 4	21,76	144	18,22	13,5

4. Ensayo inhibidor de conjugados LDC1013 contra tumores de xenoinjerto

5 Conjugados usados para el tratamiento: LDC1013

Animal: ratones desnudos, de 6-8 semanas de edad, hembras

Métodos experimentales:

10 1) Se incubaron células de cáncer de mama humano HCC1954 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio IMDM que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.15 2) Generación de tumores: se inyectaron 7 x 10⁶ células tumorales por vía subcutánea en la espalda de ratones desnudos y los ratones se agruparon para el tratamiento después de que los tamaños de los tumores fueran tan grandes como aproximadamente 180-320 mm³.

15 3) Tratamiento: 3 ratones/grupo, tratados con LDC1013 así como controles MMAE y PBS con dosis de 2,5 y 5 mg/kg cada 3 días, cuatro inyecciones.

20 4) Se supervisaron el rendimiento físico, los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los animales. El número de animales muertos se registró durante el experimento.

Resultados y análisis:

25 LDC1013 puede eliminar completamente el tumor de xenoinjerto HCC1954, después de 7 dosis de 2,5 mg/kg y 7 dosis de 5 mg/kg inyectadas cada tres días, respectivamente. Los resultados detallados se mostraron en la tabla 16.

Tabla 16. Eficacia inhibidora del conjugado LDC1013 contra tumor de xenoinjerto

Tiempo	Tumor HCC1954 trasplantado			
	2,5 mg/kg		5 mg/kg	
	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)	Peso corporal de los ratones (g)	Tamaño del tumor (mm ³)
Antes de la inyección	24,14	180	21,92	320
3 días después de la inyección 1	24,46	198	20,7	405
3 días después de la inyección 2	24,54	198	20,43	405
3 días después de la inyección 3	23,94	180	21,31	288
3 días después de la inyección 4	24,3	113	21,15	88
4 días después de la inyección 5	24,98	64	21,21	40
5 días después de la inyección 6	24,73	22	20,49	0
6 días después de la inyección 7	24,43	0	24,49	-

5. Ensayo inhibidor de conjugados LDC10BX contra tumores de xenoinjerto

Conjugados usados para el tratamiento: LDC10BX

Animal: ratones desnudos, de 6-8 semanas de edad, hembras

Métodos experimentales:

- 5 1) Se incubaron células de cáncer de pulmón humano H460 a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio IMDM que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.
- 10 2) Generación de tumores: se inyectaron 7 x 10⁶ células tumorales por vía subcutánea en la espalda de ratones desnudos y los ratones se agruparon para el tratamiento después de que los tamaños de los tumores fueran tan grandes como aproximadamente 180-320 mm³.
- 15 3) Tratamiento: 3 ratones/grupo, tratados con LDC10BX así como control LDC13A con una dosis de 10 mg/kg cada 3 días, tres inyecciones.
- 15 4) Se supervisaron el rendimiento físico, los pesos corporales y los tamaños de los tumores de los animales. El número de animales muertos se registró durante el experimento.

20 Resultados y análisis:

20 LDC10BX eliminó el tumor de xenoinjerto H460, después de 3 dosis de 10 mg/kg inyectadas cada tres días.

6. Detección de concentraciones de conjugado en modelos de tumor de xenoinjerto

25 Muestras: LDC10B, LDC10H

Animal: ratones desnudos, de 6-8 semanas de edad, hembras

Métodos experimentales:

- 30 1) La célula de cáncer de ovario humano SKOV3 y la línea celular de cáncer de mama HCC1954 se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % en medio IMDM que contenía suero bovino fetal al 10 %, las células se pasaron cada 2-3 días.
- 35 2) Generación de tumores: se inyectaron 7 x 10⁶ células tumorales por vía subcutánea en la espalda de ratones desnudos y los ratones se agruparon para el tratamiento después de que los tamaños de los tumores fueran tan grandes como aproximadamente 100~200 mm³.
- 35 3) Tratamiento: 3 ratones/grupo, 10 mg/kg, inyección peritoneal.
- 40 4) Extracción de sangre: el tiempo para la extracción de sangre antes del tratamiento se estableció en 0, se extrajo sangre a los 20 min, 2 h, 4 h y 24 h después del tratamiento. La sangre se centrifugó para recoger suero, que se congeló y se conservó.
- 45 5) Detección: la cantidad total de MMAE, LDC10B, LDC10H, así como los metabolitos MMAE de LDC10B y LDC10H en suero se detectaron mediante el equipo de ELISA anti-MMAE de ratones.

45 Resultados y análisis:

50 Se detectaron trazas de LDC10B en suero 24 h después del tratamiento, mientras que no se detectó nada de LDC10H y su metabolito MMAE, lo que indica que los fármacos libres se excretaron/metabolizaron rápidamente *in vivo*. Los resultados detallados se mostraron en la tabla 17.

50 Tabla 17: Concentraciones de conjugados en animales con tumores de xenoinjerto

Concentración (ug/ml)	LDC10B	LDC10H
Antes del tratamiento	0	0
20 min	10,8	0,77
2h	5,035	0,58
4h	0,53	0,196
24h	0,1179	0

En vista de lo anterior, los estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que:

(a) Los conjugados farmacológicos de ligandos múltiples (mLDC) se unen a las células diana y/o entran en las células diana por endocitosis y destruyen las células mediante el efecto de la carga útil citotóxica. Se han probado más de 20 líneas celulares de cáncer diferentes y los resultados han confirmado la conclusión anterior.

- 5 (b) Las imágenes *in vivo* de animales vivos mostraron que el LDC10B-Cy5 marcado con fluorescencia se concentra *in situ* de la masa tumoral y dura más de 24 horas (véase fig. 4).
- 10 (c) Los mLDC pueden eliminar completamente el tumor de xenoinjerto en modelos de ratones. La mayoría de los compuestos candidatos mostraron una eficacia excelente para controlar o eliminar tumores de xenoinjerto de una manera dependiente de la dosis y del nivel de expresión del receptor sin causar pérdida de peso u otra toxicidad evidente. Cuando los tumores se eliminaron por completo, los ratones permanecieron exentos de tumores durante el resto de sus vidas (>6 meses).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Coherent Biopharma
- 20 <120> Conjugados farmacológicos multiligandos y usos de los mismos
- 25 <130> 066138-8001WO01
- 30 <150> CN201510489556.6
<151> 11/08/2015
- 35 <160> 20
- 40 <170> PatentIn versión 3.5
- 45 <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Sitio de reconocimiento de matriz
- 55 <400> 1

Lys Ser Arg Ala Glu Asp Glu
1 5

- 60 <210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Sitio de reconocimiento de MMP-2
- 70 <400> 2

Pro Leu Gly Leu Ala Gly
1 5

- 75 <210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 80 <220>

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sitio de reconocimiento del factor Xa
5 <400> 8

Leu Glu Gly Arg
1

10 <210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sitio de reconocimiento de calpaína-a
<400> 9

Pro Leu Phe Ala Glu Pro
1 5
20

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de calpaína-2

30 <400> 10

Gly Leu Gly Ser Glu Pro
1 5

<210> 11
35 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Sitio de reconocimiento de enteropeptidasa
<400> 11

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
45

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
50

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de MMP-8
<400> 12
55

Gly Pro Ser Gly
1

5 <210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sitio de reconocimiento de proproteína convertasa 5
 <400> 13

Arg Ser Lys Arg
 1

15 <210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sitio de reconocimiento de calpaína-3
 <400> 14

Val Gly Val Phe
 1

25 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> P10
 <400> 15

Cys Lys Glu Phe Leu His Pro Ser Lys Val Asp Leu Pro Arg
 1 5 10

35 <210> 16
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> P11
 <400> 16

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Cys
 1 5 10

50 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> P12

<400> 17

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
 1 5 10

5 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> P13

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa=D-Lys

<400> 18

Glu His Trp Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Gly Cys
 1 5 10

20 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> R9

30 <400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

35 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido Tat

<400> 20

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10

45

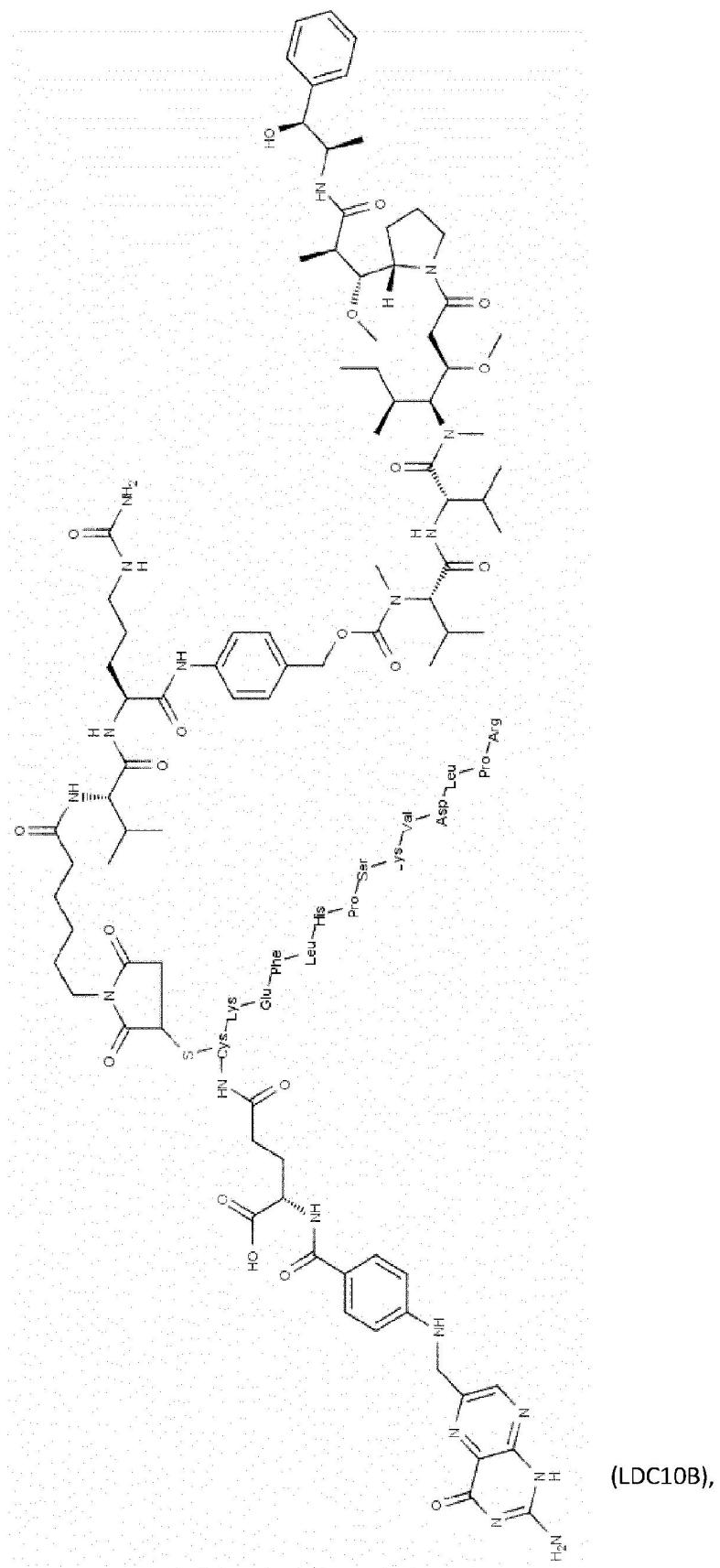
REIVINDICACIONES

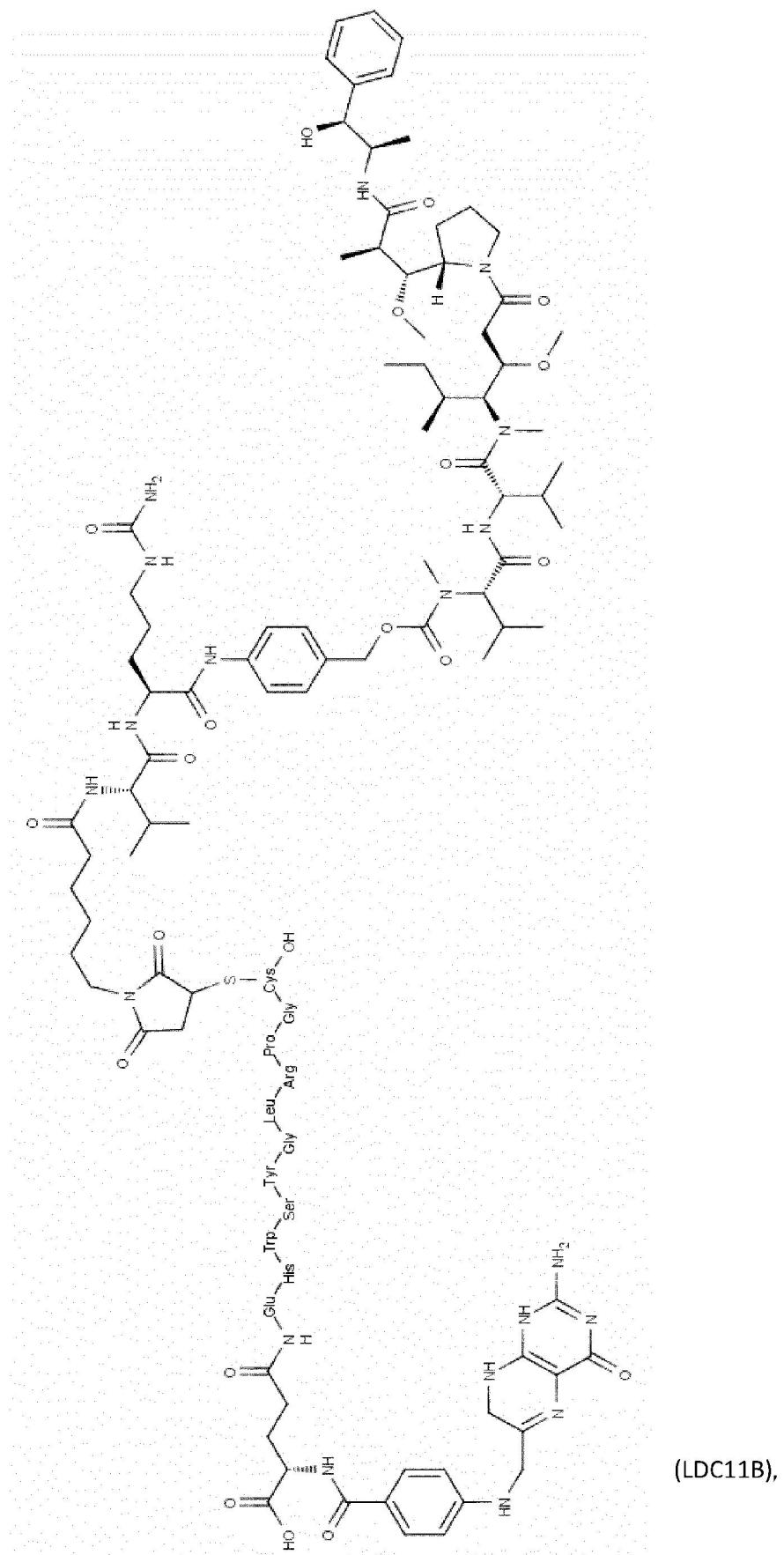
1. Un compuesto conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende una carga útil y dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células, en donde la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células, en donde los dos o más tipos de moléculas que interactúan con las células comprenden
- 5 a) un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y un segundo ligando que se une específicamente a un segundo receptor de la superficie celular, en donde el primer y segundo receptores de la superficie celular son diferentes entre sí; o
- 10 b) un primer ligando que se une específicamente a un primer receptor de la superficie celular y una molécula de endocitosis capaz de mediar en la endocitosis,
- 15 en donde el primer y segundo receptores de la superficie se seleccionan del grupo que consiste en un receptor de transferrina (TFR), un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), un receptor de ácido úrico cinasa, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), un receptor de somatostatina-14 (SST-14), un receptor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y un receptor del miembro 6 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial de receptor transitorio (TRPV6); y
- 20 la molécula de endocitosis se selecciona del grupo que consiste en folato y análogos del mismo, seleccionado del grupo que consiste en 5-metiltetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato, metotrexato y 5,10-metilentetrahidrofolato, y un péptido de penetración celular, seleccionado del péptido de penetración celular que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20.
- 25 2. El compuesto conjugado de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 30 a) en donde la carga útil se conjuga con al menos una de las moléculas que interactúan con las células a través de un conector; y/o
- 35 b) en donde al menos dos de las moléculas que interactúan con las células son ligandos que se unen de forma específica a un receptor de la superficie celular.
- 40 3. El compuesto conjugado de la reivindicación 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 45 a) preferentemente en donde la carga útil se conjuga con el primer ligando y el primer ligando se conjuga con el segundo ligando, más preferentemente en donde el primer ligando se conjuga con el segundo ligando a través de un espaciador, especialmente en donde el espaciador comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-14, Arg-Arg, Ala-Ser-Asn, Ala-Ala-Ala, Ser-Ser-Arg, Pro-Arg y Pro-Leu-Gly o preferentemente en donde la carga útil se conjuga directamente con cada uno del primer ligando y el segundo ligando, o preferentemente en donde la carga útil se conjuga con el primer ligando a través de un primer conector y la carga útil se conjuga con el segundo ligando a través de un segundo conector; y/o
- 50 b) preferentemente que comprende además un tercer ligando que se une específicamente a un tercer receptor de la superficie celular, más preferentemente en donde el primer, segundo y tercer receptores de la superficie celular son diferentes entre sí.
- 55 4. El compuesto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 60 a) que comprende una, dos, tres, cuatro o más cargas útiles; y/o
- 65 b) en donde la carga útil se selecciona del grupo que consiste en un compuesto de molécula pequeña, un nucleótido, un péptido y una proteína, preferentemente en donde la carga útil es un compuesto de molécula pequeña, especialmente en donde el compuesto de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en maitansina y cualquier derivado de la misma, taxinol y cualquier derivado del mismo, auristatinas y cualquier derivado de las mismas, epotilonas y cualquier derivado de las mismas, bleomicina y cualquier derivado de la misma, dactinomicina y cualquier derivado de la misma, plicamicina y cualquier derivado de la misma y miromicina C, más especialmente en donde el compuesto de molécula pequeña es auristatina o cualquier derivado de la misma.
5. El compuesto conjugado de la reivindicación 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el primer, segundo y tercer ligando se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en un péptido, folato y análogos del mismo,
- 60 preferentemente en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 15 y un péptido homólogo que tiene al menos 70 % de homología de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 15, en donde el péptido homólogo es un equivalente funcional del péptido de la SEQ ID NO: 15 o preferentemente en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, Arg-Gly-Asp, un péptido homólogo que tiene al menos 70 % de homología de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las SEQ ID NO: 16-18, en donde el péptido homólogo es un equivalente funcional de uno cualquiera de los péptidos de las SEQ ID NO: 16-18.

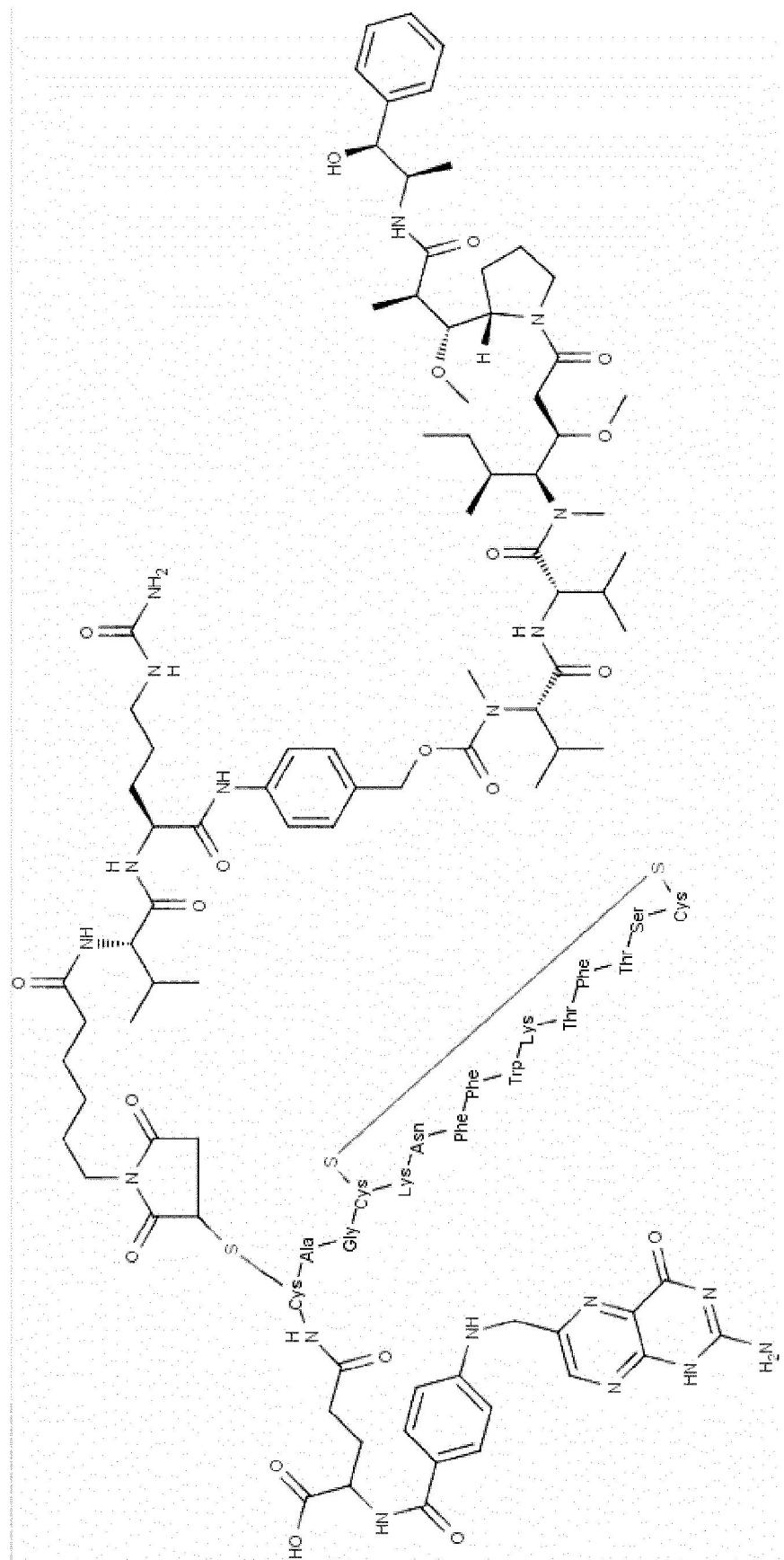
6. El compuesto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el conector es un conector peptídico, un conector de disulfuro o un conector dependiente del pH, preferentemente

- 5 a) en donde el conector peptídico es escindible en un determinado entorno fisiológico mediante escisión o reducción por proteasa y/o
- b) en donde el conector peptídico se selecciona del grupo que consiste en valina-citrulina, fenilalanina-lisina y valina-lisina, o
- c) en donde el conector peptídico se selecciona del grupo que consiste en DMDS, MDS, DSDM y NDMDS, o
- 10 d) en donde el conector dependiente del pH es anhídrido *cis*-aconítico.

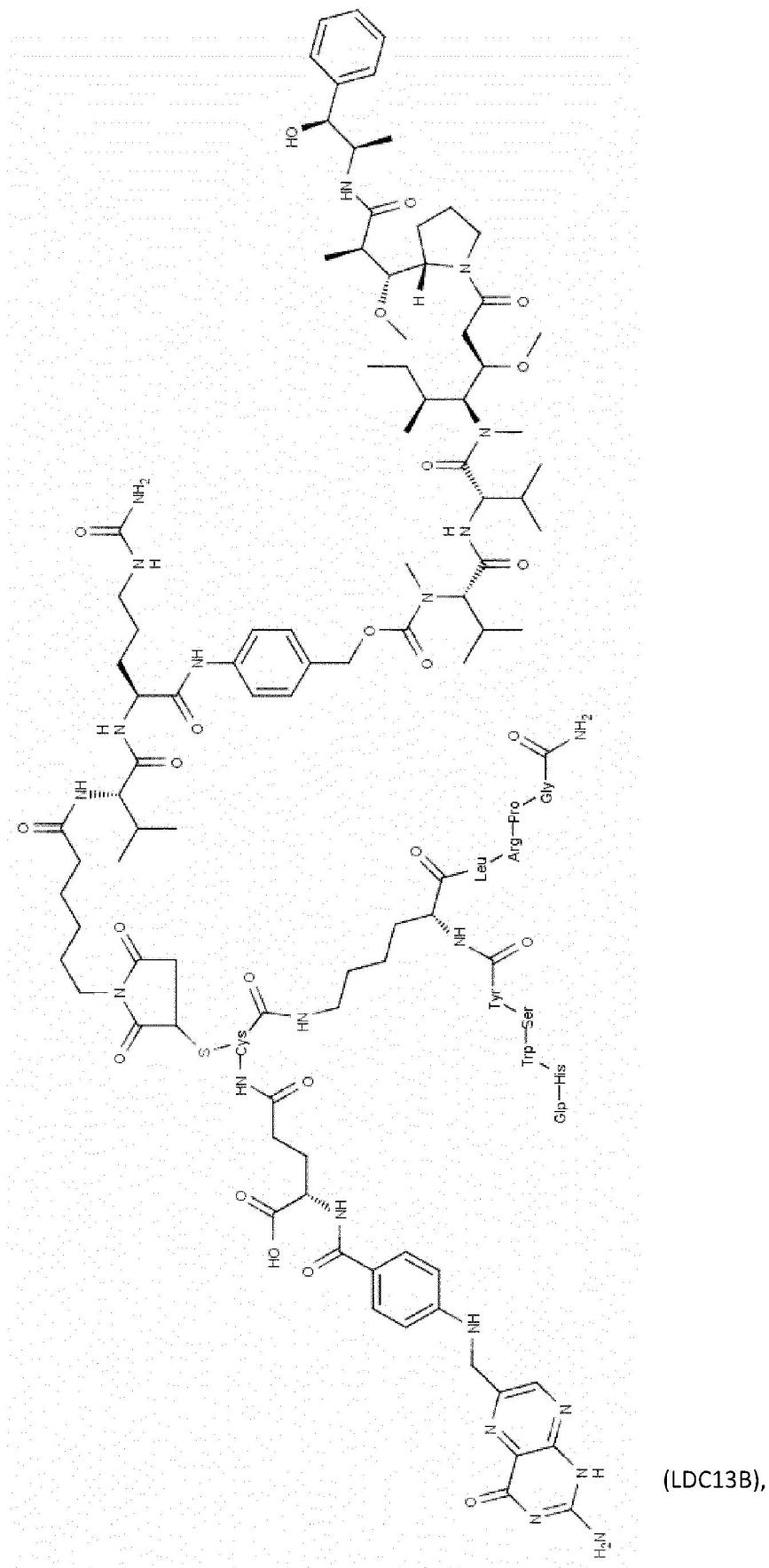
7. El compuesto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto conjugado se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos:



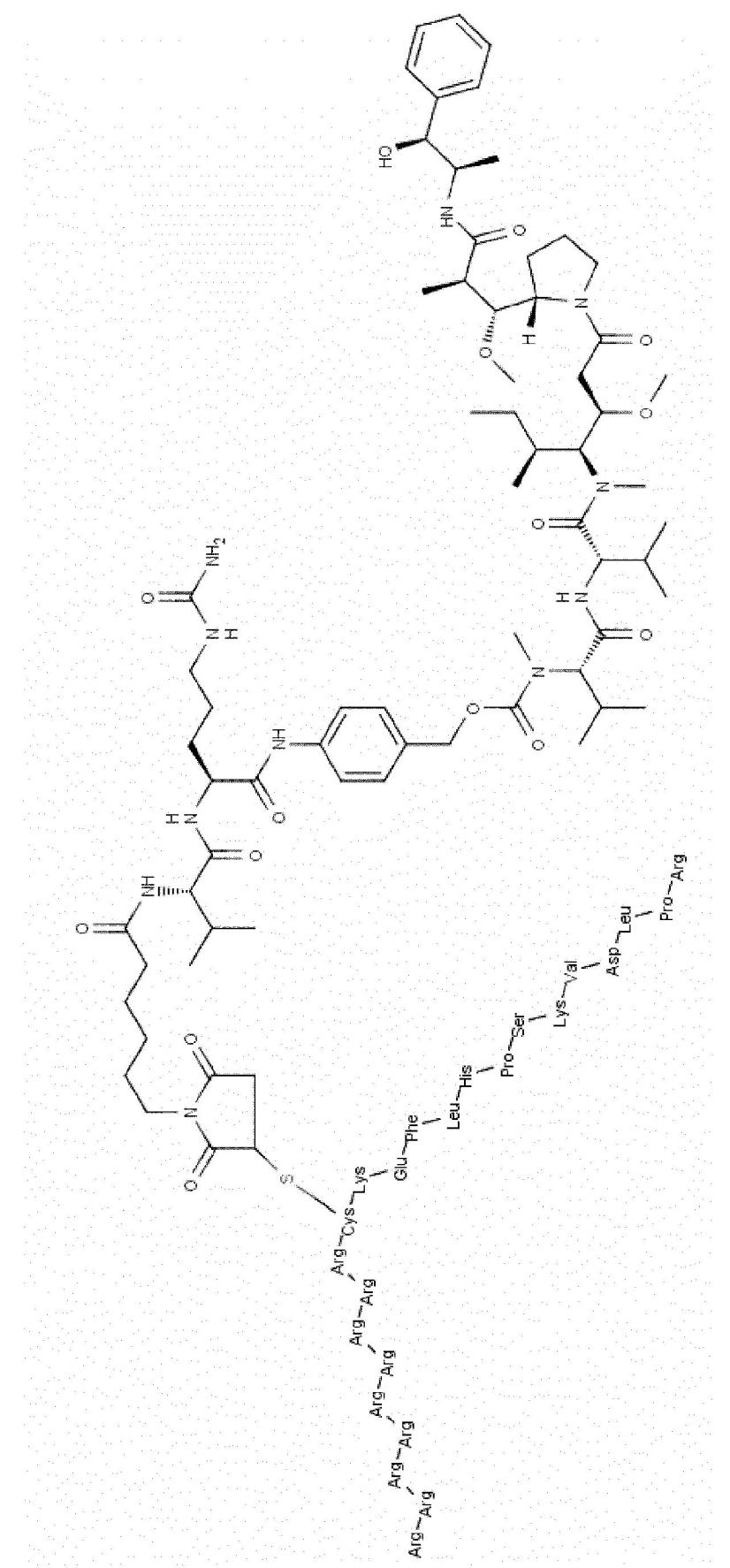


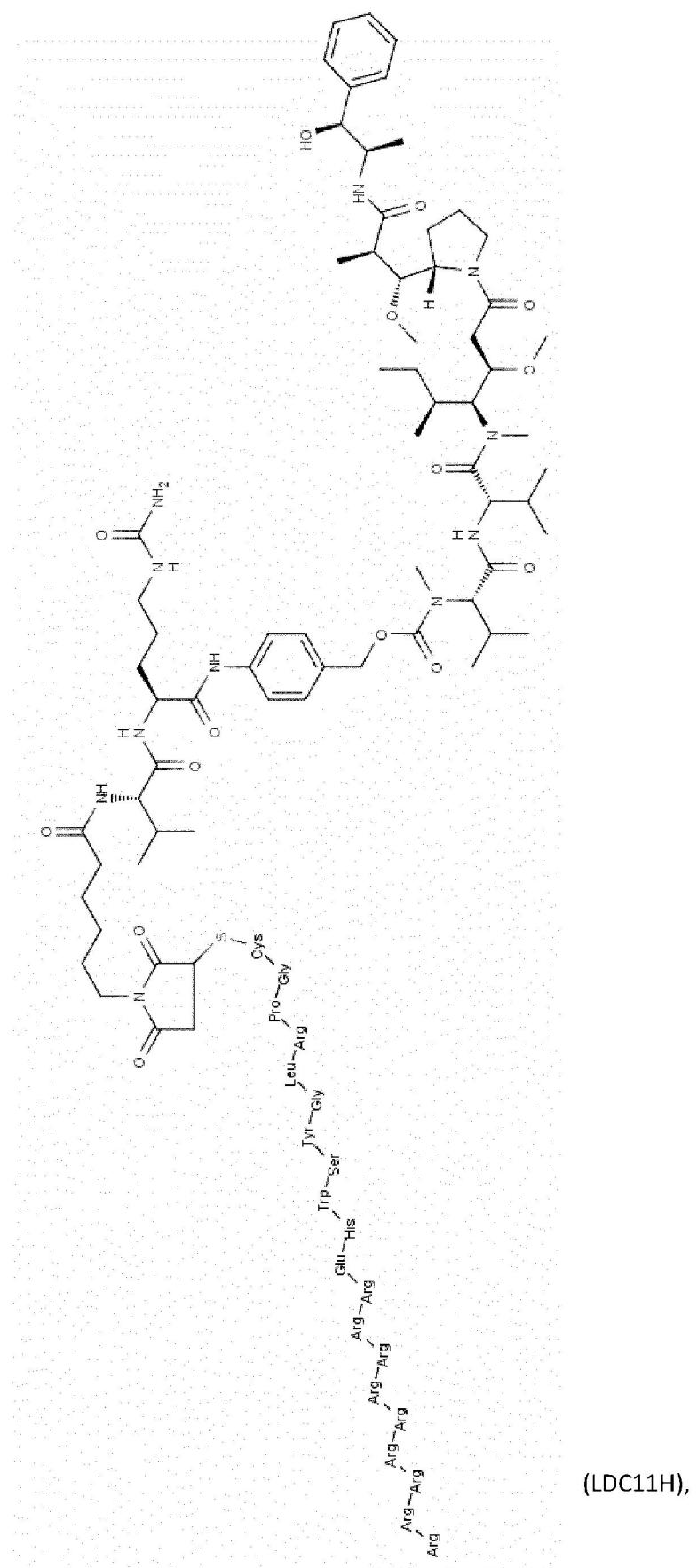


(LDC12B),

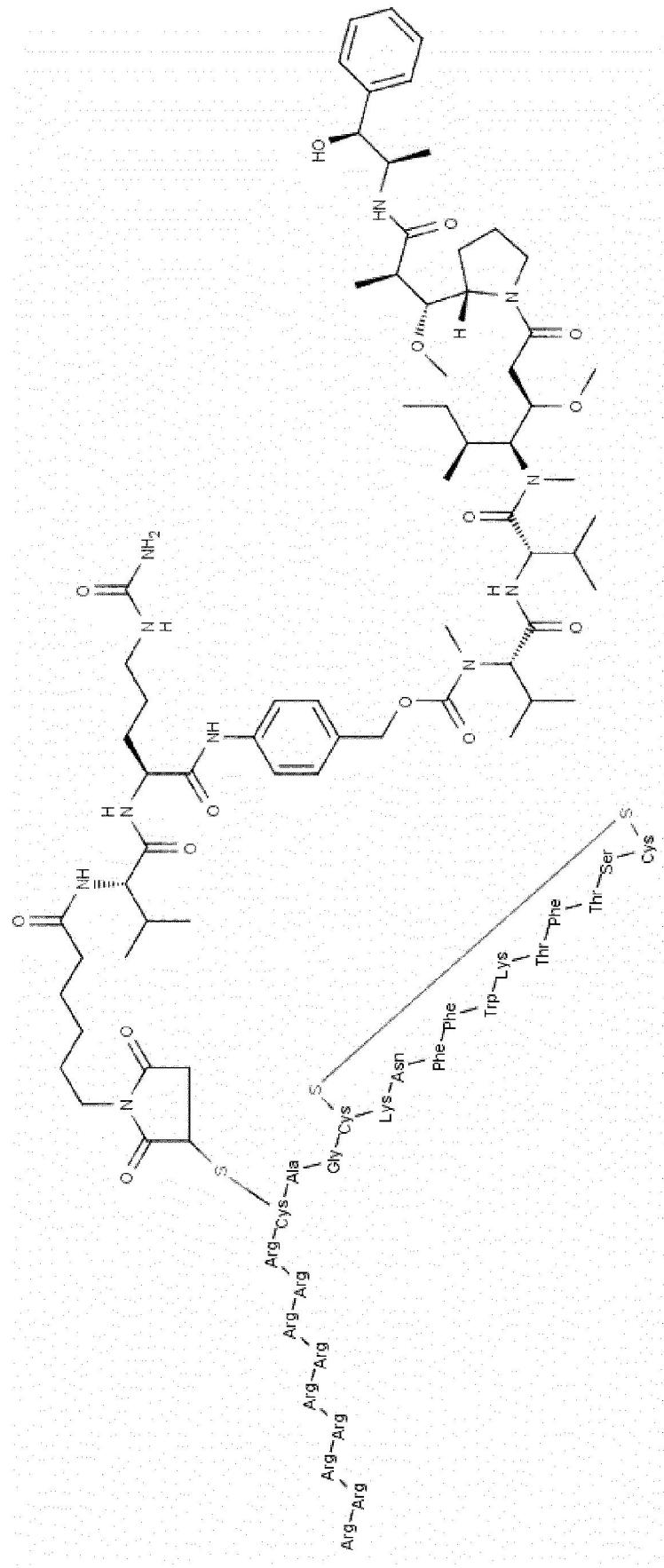


(LDC13B),

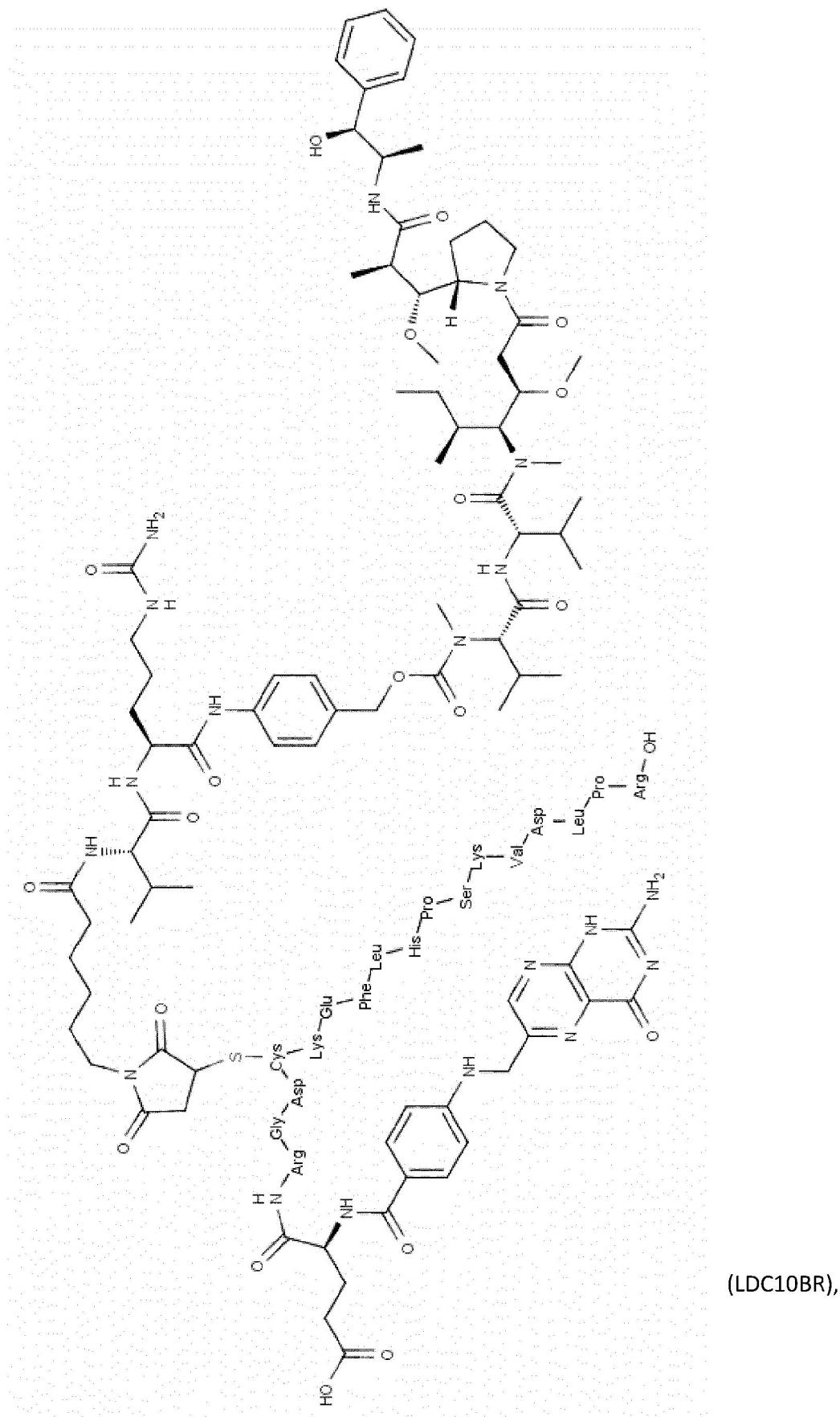




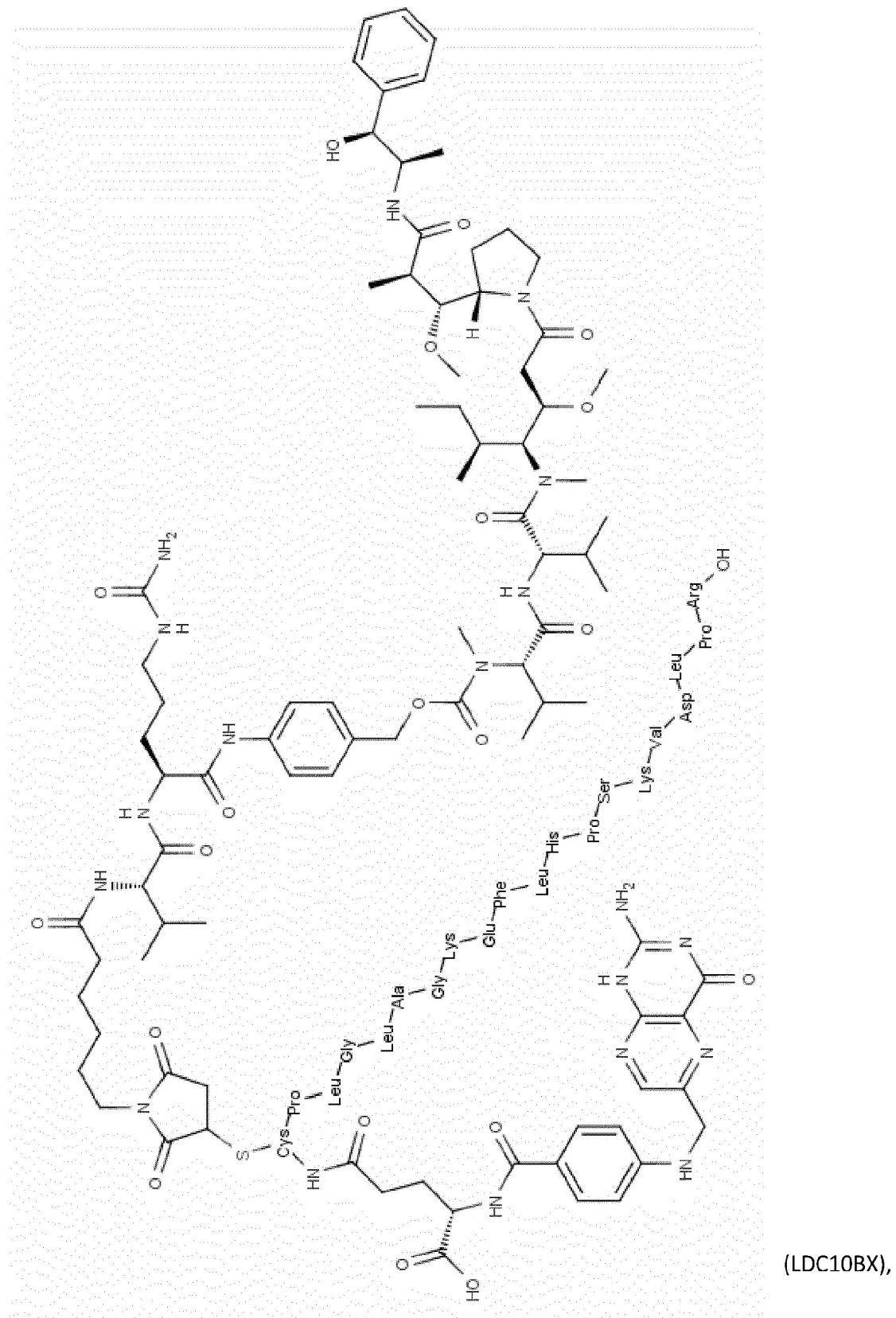
(LDC11H),

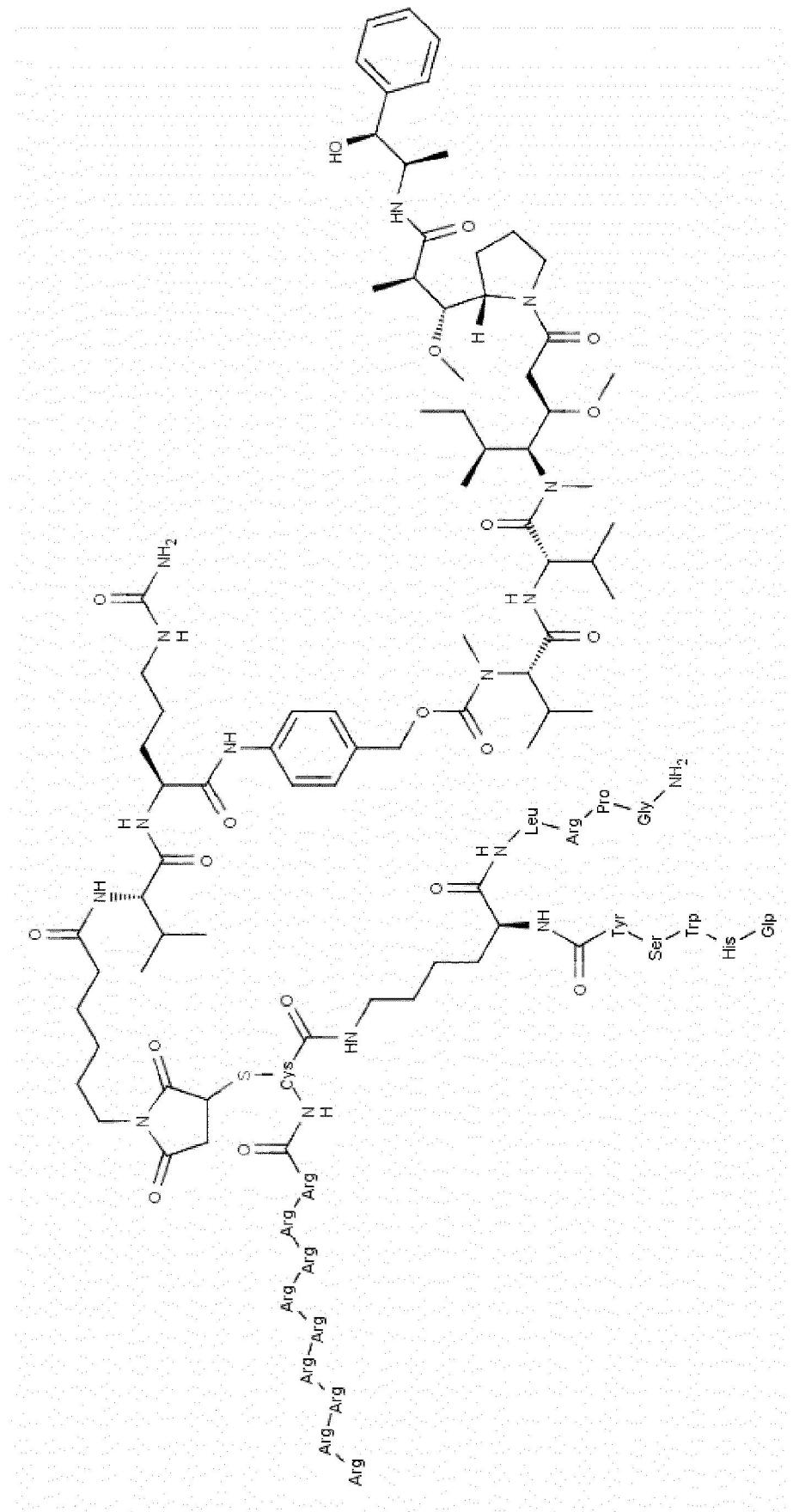


(LDC12H),



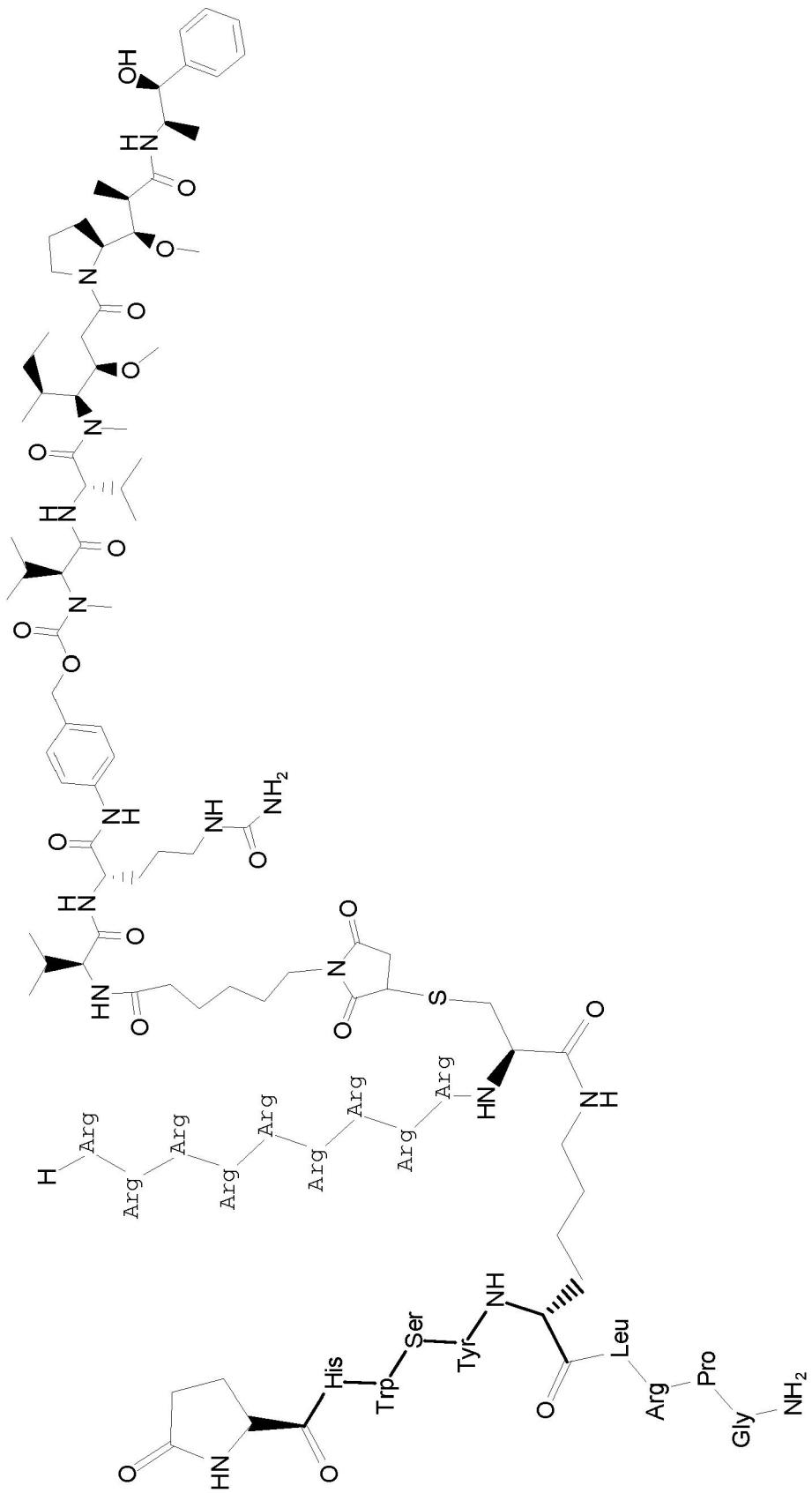
(LDC10BR),





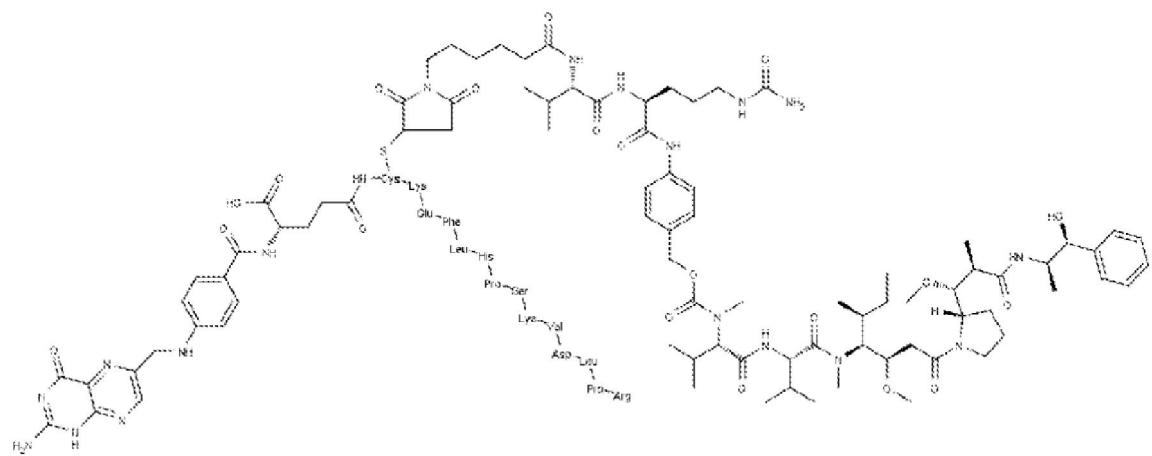
(LDC1013)

y

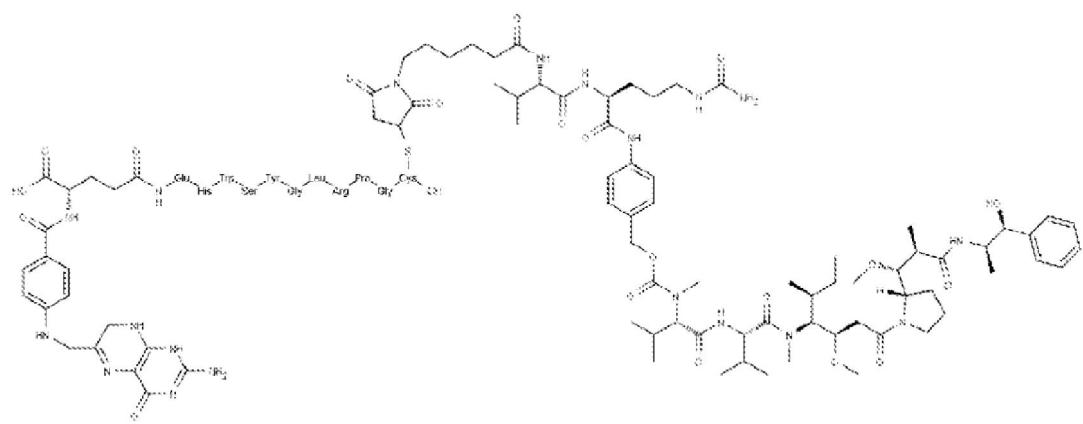


(LDC13H).

8. El compuesto conjugado de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 5 a) que comprende la carga útil, una primera molécula de endocitosis y una segunda molécula de endocitosis, en donde la primera molécula de endocitosis es igual que la segunda molécula de endocitosis; o
- b) que comprende la carga útil, una primera molécula de endocitosis y una segunda molécula de endocitosis, en donde la primera molécula de endocitosis es diferente de la segunda molécula de endocitosis, preferentemente en donde la primera molécula de endocitosis es una molécula de penetración celular.
- 10 9. El compuesto conjugado de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la carga útil, el primer ligando que se une específicamente a un receptor de la superficie celular y la molécula de endocitosis.
- 15 10. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente en donde la composición se va a administrar por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía oral, por vía intramuscular o por vía intraventricular.
- 20 11. El compuesto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso como medicamento para suministrar una carga útil a un sujeto que lo necesite, en donde el medicamento debe administrarse al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica.
- 25 12. El compuesto conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en un método para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica.
- 30 13. El compuesto conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 12, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad inmunológica, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad metabólica y una enfermedad neurológica, preferentemente
- 35 a) en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de útero, carcinoma de endometrio, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de piel, linfoma, mieloma múltiple; o
- b) en donde la enfermedad inmunológica es una enfermedad autoinmunitaria, especialmente en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad del tejido conjuntivo, esclerosis sistémica, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico; o
- 40 c) en donde la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en angina, infarto de miocardio, ictus, ataque cardíaco, cardiopatía hipertensiva, cardiopatía reumática, miocardiopatía, arritmia cardíaca y cardiopatía congénita; o
- 45 d) en donde la enfermedad metabólica se selecciona del grupo que consiste en diabetes, gota, obesidad, hipoglucemia, hiperglucemia y dislipidemia; o
- e) en donde la enfermedad neurológica se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, lesión craneal, esclerosis múltiple, vértigo, coma y epilepsia; y/o
- 50 f) en donde el método comprende además la administración de uno o más agentes terapéuticos en combinación con el compuesto conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica, más preferentemente en donde el agente terapéutico se dirige a una diana terapéutica antineoplásica, induce o estimula la respuesta inmunitaria contra el cáncer o es un agente quimioterapéutico.

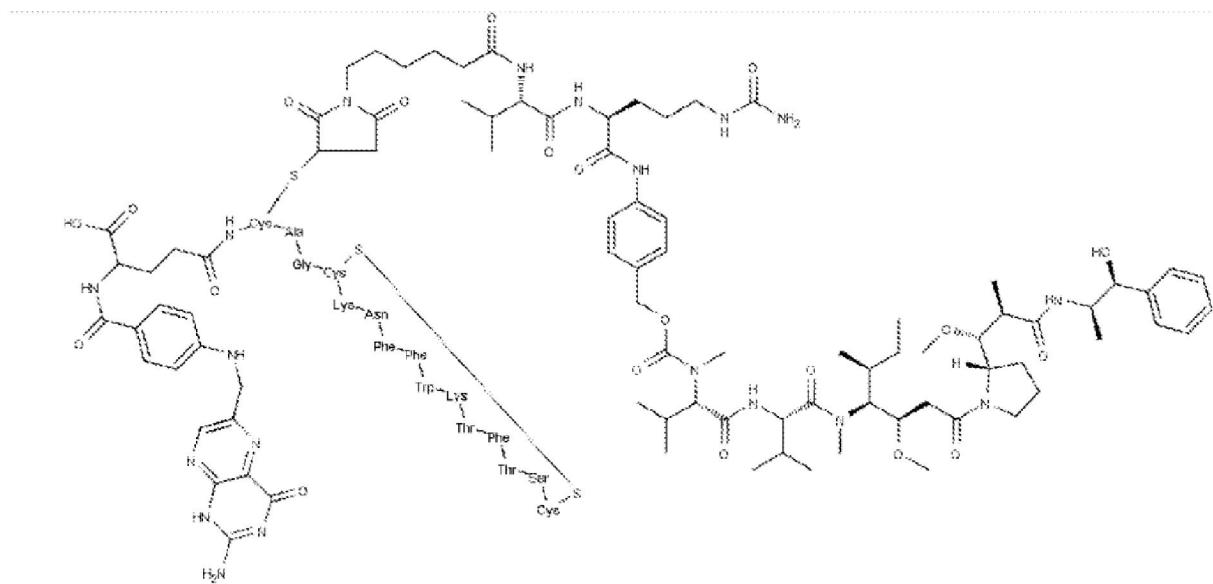


LDC10B

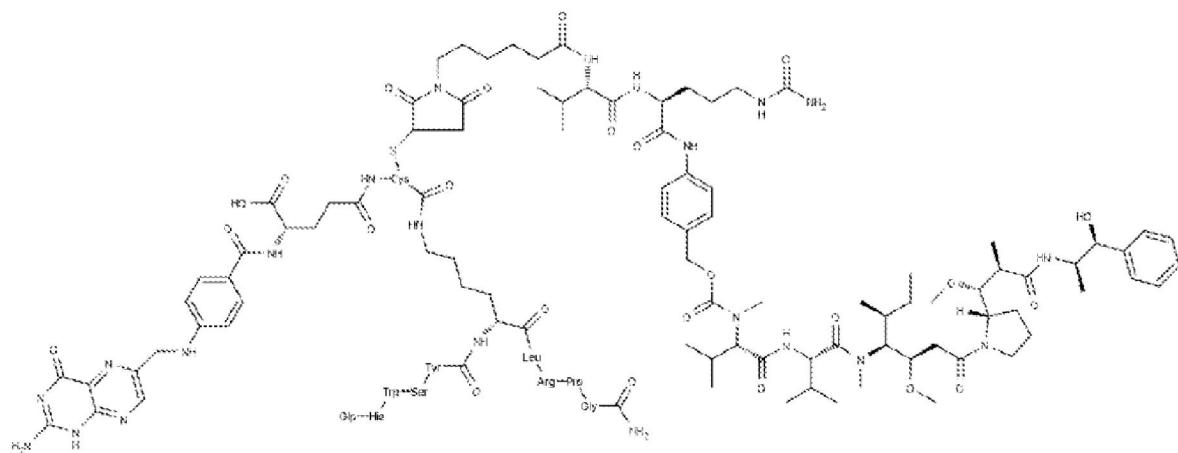


LDC11B

Figura 1

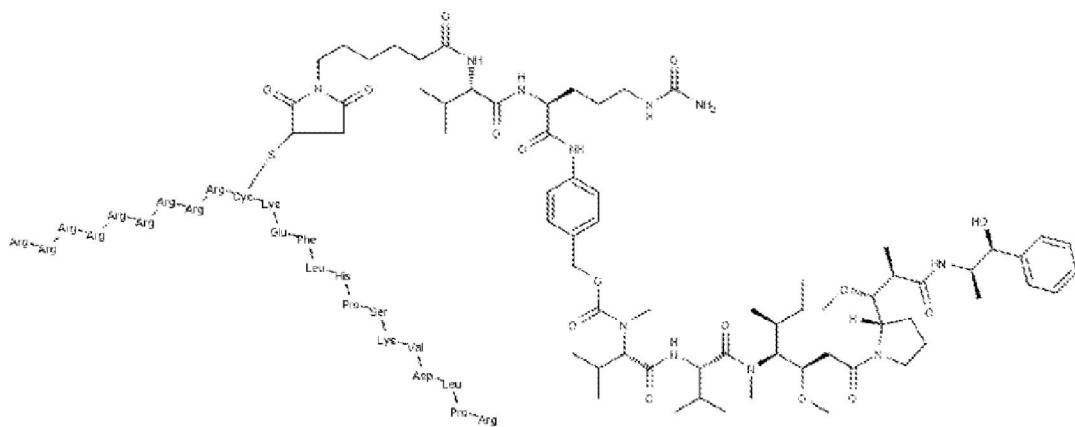


LDC12B

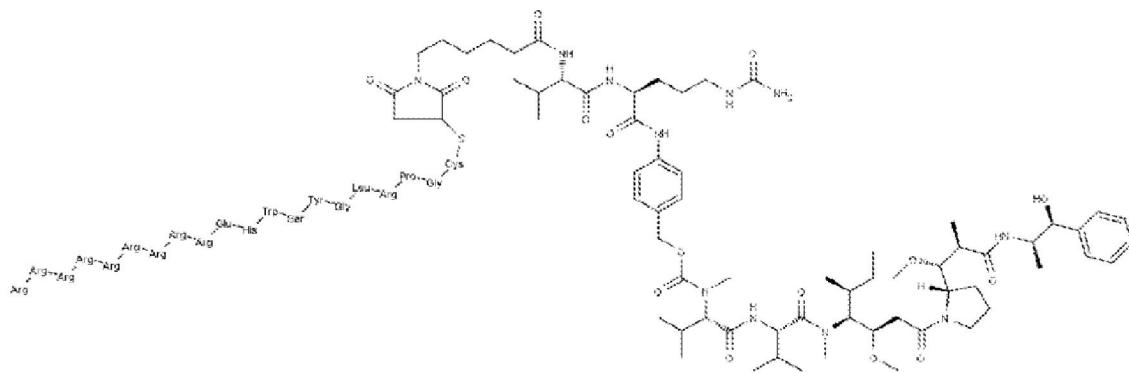


LDC13B

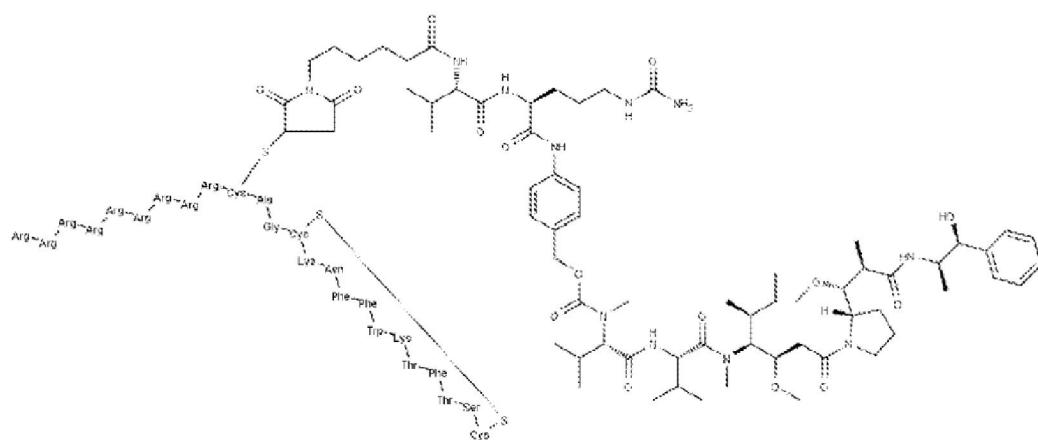
Figura 1 (continuación)



LDC10H

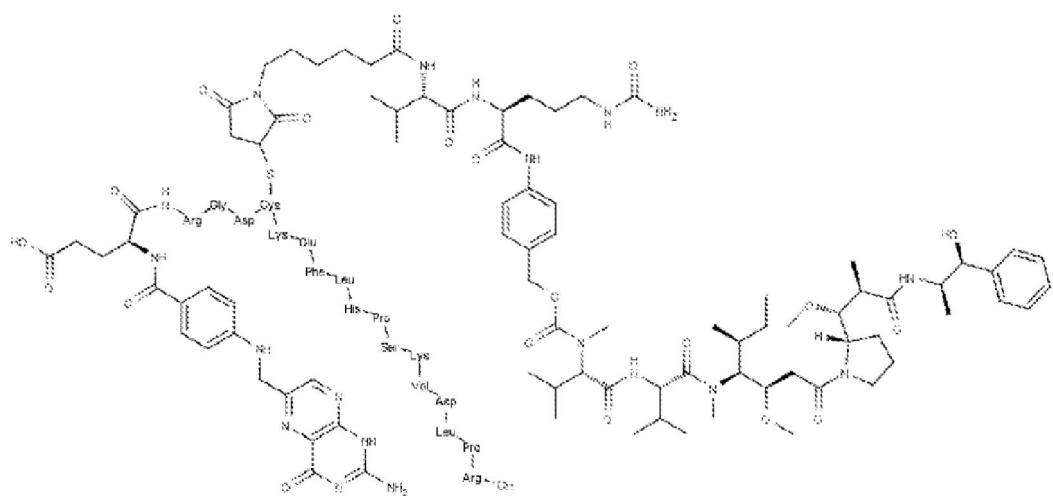
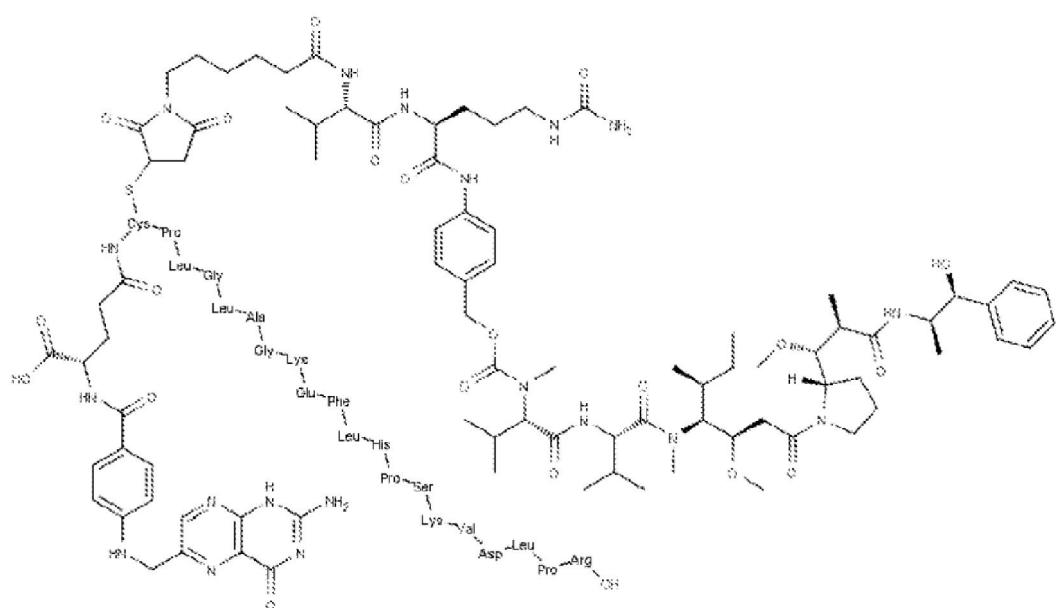


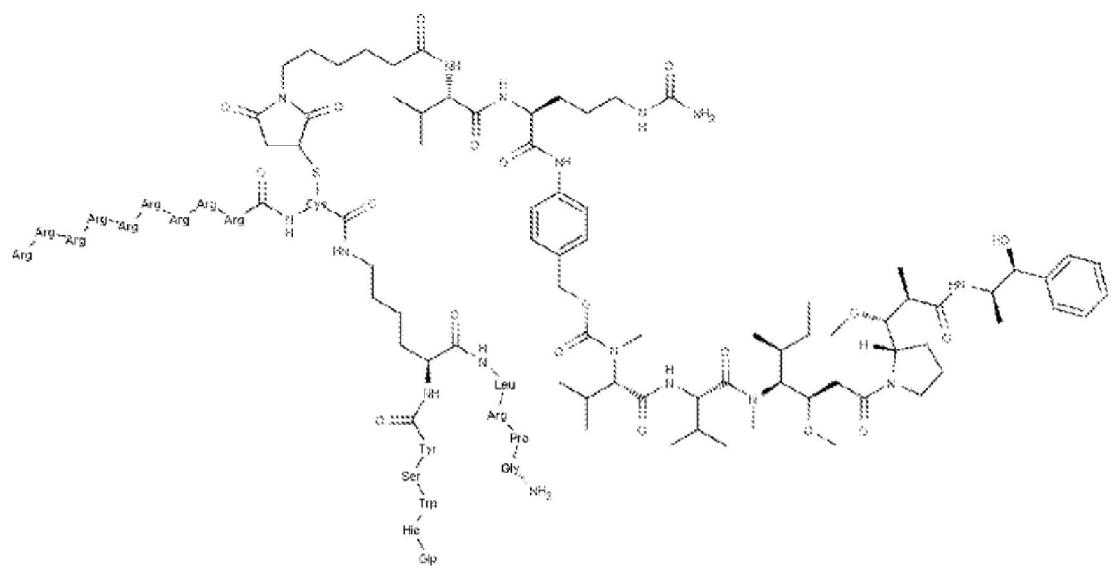
LDC11H



LDC12H

Figura 1 (continuación)

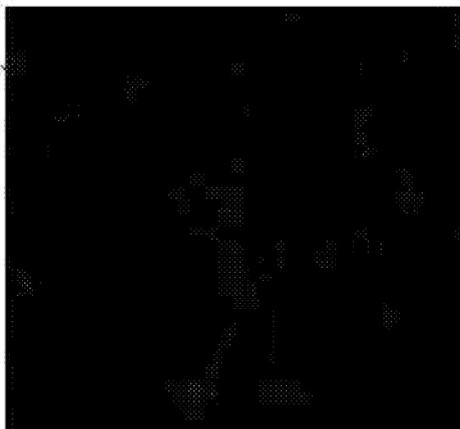
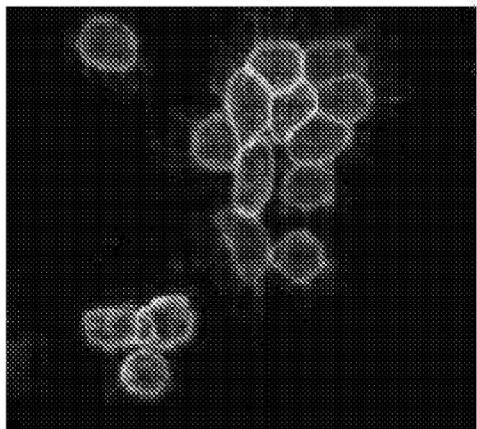
**LDC10BR****LDC10BX****Figura 1 (continuación)**



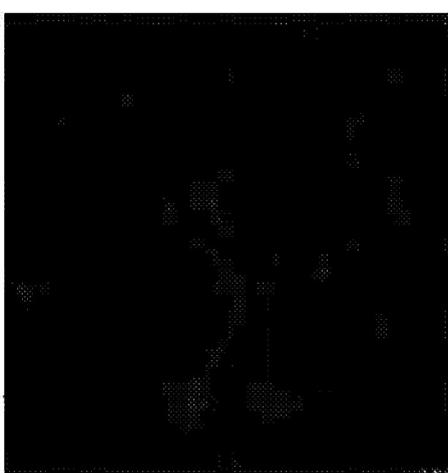
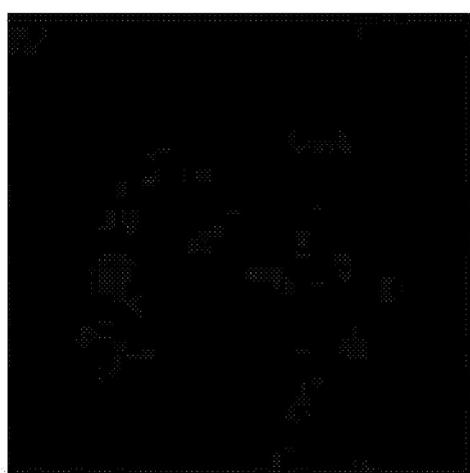
LDC1013

Figura 1 (continuación)

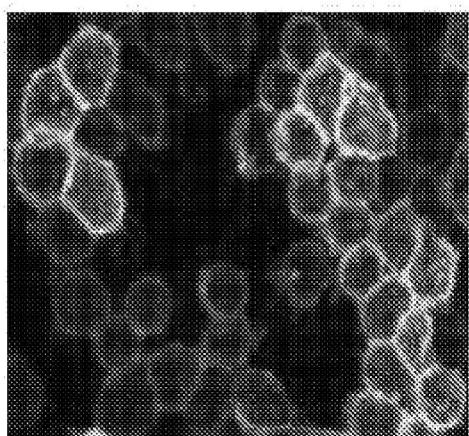
A: KB+Folato-FITC B: A375+Folato-FITC



C: KB+10A-FITC D: A375+10A-FITC



E: KB+10B-FITC



F: A375+10B-FITC

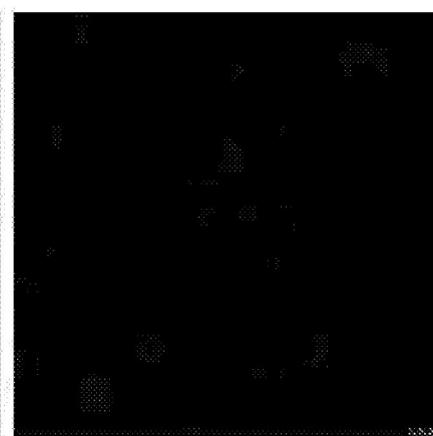
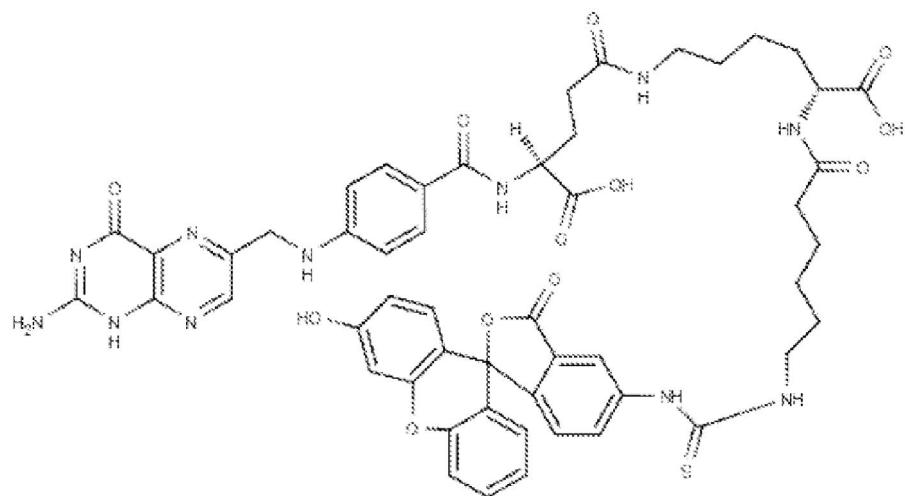
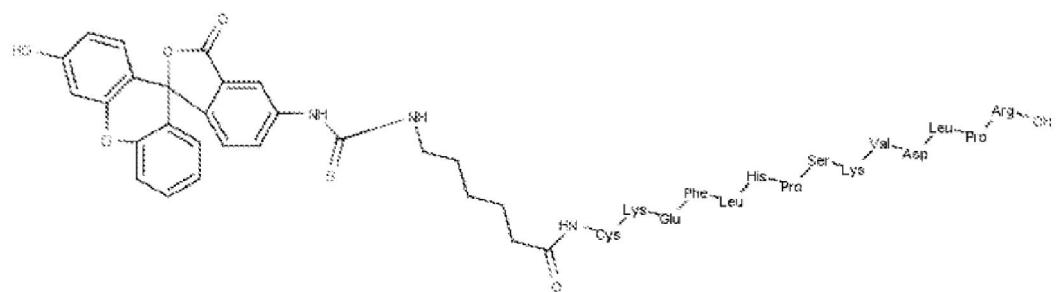


Figura 2

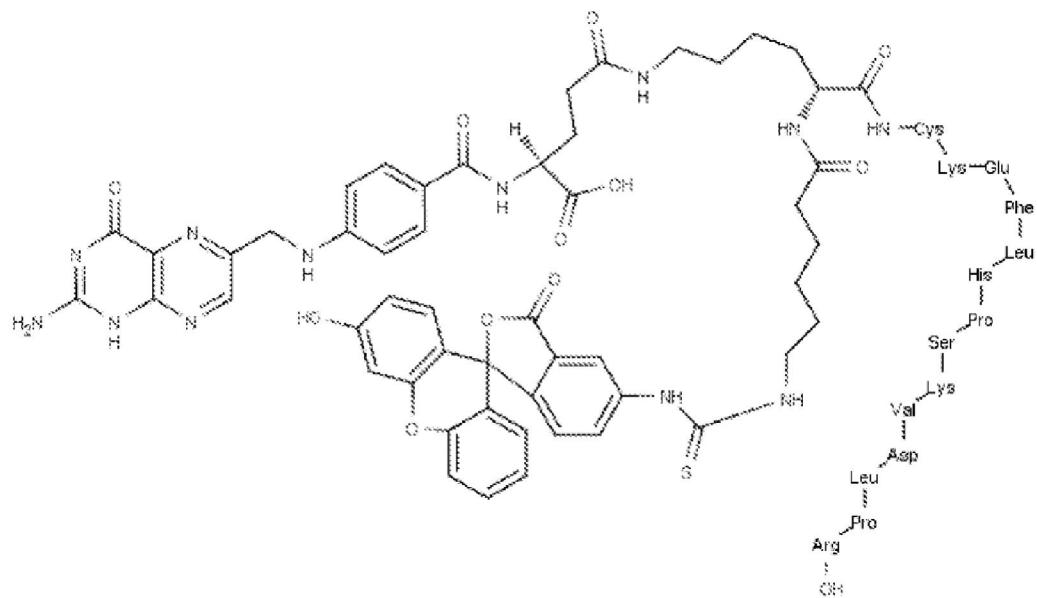


Folato-FITC



10A-FITC

Figura 3



10B-FITC

Figura 3 (continuación)

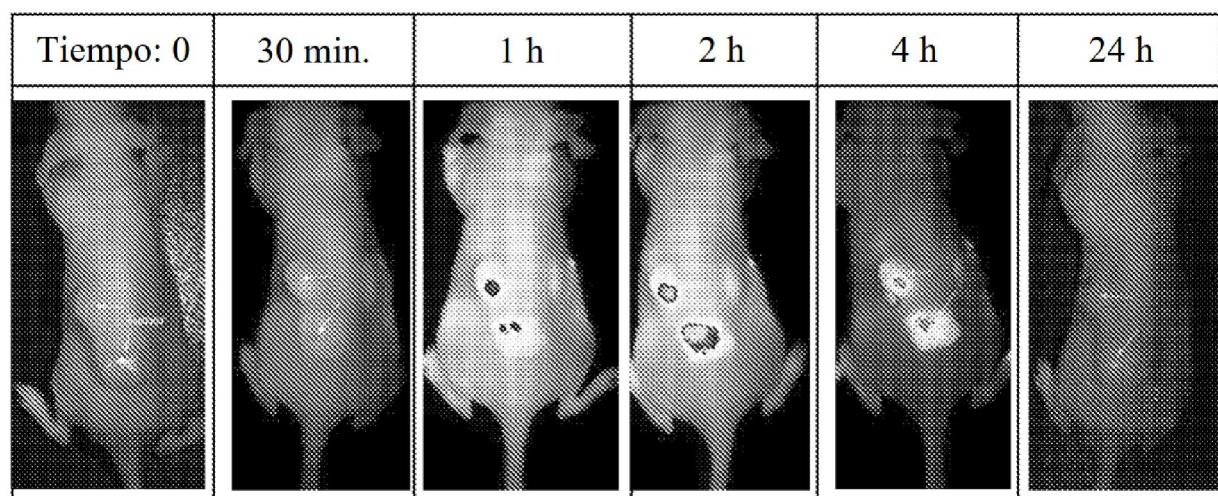


Figura 4