

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 003**

51 Int. Cl.:

A61K 47/55 (2007.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 103/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2021** **PCT/US2021/056610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2022** **WO22093793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2021** **E 21810835 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023** **EP 4103236**

54 Título: **Conjugados de nanopartículas y fármacos dirigidos a receptor de folato y usos de los mismos**

30 Prioridad:

27.10.2020 US 202063105995 P
20.11.2020 US 202063116393 P
23.11.2020 US 202063117110 P
01.03.2021 US 202163155043 P
15.07.2021 US 202163222181 P
09.09.2021 US 202163242201 P
12.10.2021 US 202163254837 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.03.2024

73 Titular/es:

ELUCIDA ONCOLOGY, INC. (100.0%)
1 Deer Park Drive, Suite E
Monmouth Junction, NJ 08852, US

72 Inventor/es:

MA, KAI;
VENKATESAN, ARANAPAKAM, M.;
CHEN, FENG;
WU, FEI;
TÜRKER, MELIK, ZIYA;
GARDINIER, THOMAS, COURTNEY, II;
GERMANO, GENO, J., JR.;
ADAMS, GREGORY, PAUL y
LEE, FRANCIS, Y., F.

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 963 003 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 de nanopartículas y fármacos dirigidos a receptor de folato y usos de los mismos

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 63/105,995, presentada el 27 de octubre de 2020, Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 63/116,393, presentada el 20 de noviembre de 2020, Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 63/117,110, presentada el 23 de noviembre de 2020, Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 63/155,043, presentada el 1 de marzo de 2021, Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 63/222,181, presentada el 15 de julio de 2021, Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 63/242,201, presentada el 9 de septiembre de 2021, y Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 63/254,837, presentada el 12 de octubre de 2021.

15 ANTECEDENTES

[0002] La administración dirigida de agentes terapéuticos (por ejemplo, fármacos citotóxicos) a células cancerosas es un enfoque emergente para el tratamiento del cáncer. La toxicidad de los tratamientos administrados a tejidos u órganos sanos de un sujeto se puede reducir en gran medida mediante la administración selectiva de fármacos a un área de enfermedad seleccionada, lo que conduce a mejores resultados terapéuticos. Los conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC, *antibody drug conjugates*) son una plataforma popular para la administración dirigida de fármacos, que normalmente presentan una sustancia farmacológica altamente tóxica unida de manera covalente a un anticuerpo monoclonal que puede reconocer el cáncer, en donde la sustancia farmacológica tóxica se libera al reconocerse el cáncer. Sin embargo, aún quedan muchos desafíos con las plataformas convencionales de administración de fármacos dirigidos, tales como los ADC, incluidas las dificultades de producción, las limitaciones en la capacidad de carga de fármacos, la escasa penetración del tumor y la falta de capacidad para superar la heterogeneidad del tumor.

[0003] La Universidad de Cornell y el Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering desarrollaron nanopartículas híbridas orgánicas y de sílice ultrapequeñas de menos de 10 nm, denominadas puntos primarios de Cornell (C'Dots), que tienen un potencial significativo en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Por ejemplo, los C'Dots se pueden conjugar con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico, por ejemplo, gefitinib, que es un agente dirigido al cáncer que inhibe el crecimiento del cáncer (WO 2015/183882 A1). Sin embargo, el mecanismo de acción (MOA) de los inhibidores de EGFR requiere una unión activa al receptor del factor de crecimiento epidérmico, por lo que se requiere una alta concentración continua de la carga útil en la célula cancerosa diana para inhibir de manera eficaz la proliferación de células cancerosas. Este tipo de MOA generalmente no es compatible con la semivida de rápida circulación sanguínea de los C'Dots.

[0004] El receptor de folato alfa (FR α), también conocido como FOLR1, ha recibido una atención significativa por parte de la comunidad científica como una diana potencial para la terapia contra el cáncer, y también se han identificado otras isoformas de FR como potenciales dianas biológicas. Véase, por ejemplo, Targeting Folate Receptor Alpha for Cancer Treatment, Cheung, A. et al. *Oncotarget* (2016) 7 (32): 52553; Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments, Ledermann, JA et al., *Annals of Oncology* (2015), 26:2034-2043. El receptor de folato (FR) es una diana ideal para la terapia contra el cáncer, ya que el FR puede sobreexpresarse en tumores, tales como los de ovario, endometrio, mama, colon y pulmón, pero su distribución en los tejidos normales es baja y restringida. Nuevos conocimientos han sugerido que el FR también puede exhibir funciones de señalización y regulación del crecimiento celular, además de servir como receptor y transportador de folato. Estas características juntas hacen de FR una diana terapéutica atractiva.

[0005] El ácido fólico se transporta al interior de las células mediante diversos mecanismos, y el mecanismo más frecuente es la mediación a través de receptores de folato, de los cuales hay cuatro miembros glucopéptidos (FR alfa [FOLR1], FR beta [FOLR2], FR gamma [FOLR3] y FR delta [FOLR4]). Entre estos cuatro miembros, la isoforma alfa (FR alfa o FR α) es una proteína de membrana anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) con alta afinidad por unirse y transportar la forma activa de folato, el 5-metiltetrahidrofolato (5MTF). Se ha descrito que la isoforma alfa está sobreexpresada en ciertos tumores sólidos, por ejemplo, en cáncer de ovario, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de peritoneo primario, cáncer de útero, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer gastrointestinal y carcinomas de mama. La isoforma alfa también se sobreexpresa en ciertas neoplasias hematológicas, lo que puede aprovecharse para el tratamiento de estas neoplasias, por ejemplo, para el tratamiento del linfoma mieloide agudo (AML), incluida el AML pediátrico. Esta distribución baja y restringida en tejidos o células normales, junto con conocimientos emergentes sobre las funciones promotoras de tumores y la asociación de la expresión con el pronóstico del paciente, hacen de FR α una diana terapéutica atractiva. Además, la isoforma beta (FR β) se sobreexpresa en ciertos cánceres, por ejemplo, neoplasias malignas hematológicas, tales como la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia mielógena crónica (CML), lo que brinda la oportunidad de desarrollar terapias dirigidas para estos cánceres.

[0006] Aunque en el pasado se han desarrollado y probado muchas plataformas de administración de fármacos dirigidas a FR para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, utilizando tanto ADC como conjugados de fármacos de

molécula pequeña, ninguna de ellas se ha aprobado con éxito para uso clínico debido a su resultado terapéutico limitado (documentos EP 0624377 A2, US 9192682 B2, Leamon, et al., "Comparative preclinical activity of the folate-targeted Vinca alkaloid conjugates EC140 y EC145, Int J. Cancer (2007) 121:1585-1592; Leamon et al., "Folate-Vinca Alkaloid Conjugates for Cancer Therapy: A Structure-Activity Relationships, Bioconjugate Chemistry (2014) 25: 560-568; Scaranti, M., et al. Exploiting the folate receptor α in oncology. Nat Rev Clin Oncol. (2020) 17: 349-359).

[0007] Por lo tanto, sigue siendo muy deseable el desarrollo exitoso de una plataforma de administración de fármacos dirigida a FR.

10 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0008] La presente invención da a conocer conjugados de nanopartículas-fármaco (NDC), composiciones farmacéuticas que comprenden NDC y usos de los mismos, tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la presente invención da a conocer un conjugado de nanopartícula-fármaco (NDC) que comprende: (a) una nanopartícula de sílice; (b) polietilenglicol (PEG) que está unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula; (c) un ligando dirigido que comprende ácido fólico, en el que el ligando dirigido está unido a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador; y (d) un conjugado enlazador-carga útil, en el que: (i) la carga útil es exatecán; (ii) el conjugado de enlazador-carga útil está unido a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador; (iii) el enlazador es un enlazador escindible por proteasa; y (iv) el exatecán se libera tras la escisión del enlazador. En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende un NDC según la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable, de manera opcional en la que la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa y/o en la que la composición farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria. En un aspecto adicional, la presente invención da a conocer un NDC o composiciones farmacéuticas según la presente invención para uso en medicina, incluido el uso en el tratamiento del cáncer.

[0009] La presente divulgación da a conocer un conjugado de nanopartícula-fármaco (NDC) que comprende: (a) una nanopartícula de sílice y polietilenglicol (PEG) unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula; (b) un ligando dirigido que comprende ácido fólico, o un derivado o sal del mismo, en el que el ligando dirigido está unido a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador; y (c) un conjugado de enlazador-carga útil, en el que: (i) la carga útil es exatecán; (ii) el conjugado de enlazador-carga útil está unido a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador; (iii) el enlazador es un enlazador escindible por proteasa; y (iv) el exatecán se libera tras la escisión del enlazador.

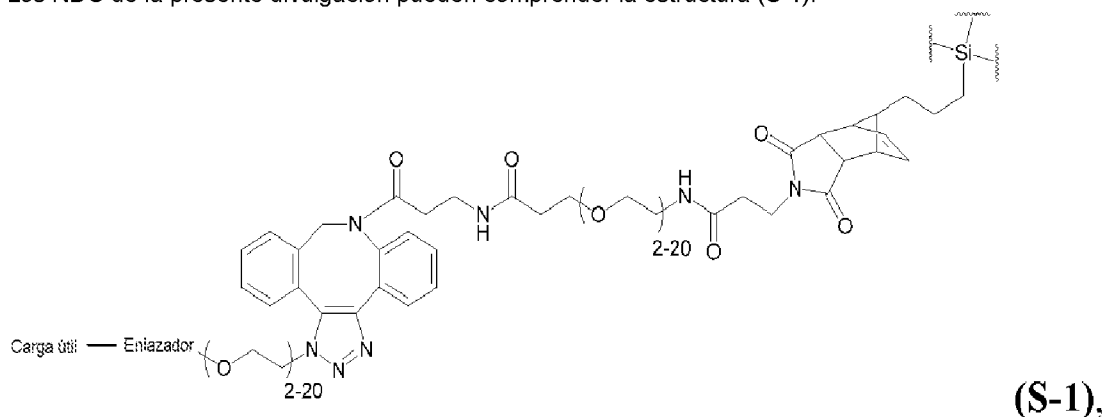
[0010] La presente divulgación también se refiere a conjugados de nanopartícula-fármaco (NDC) que comprenden: (a) una nanopartícula que comprende un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo; polietilenglicol (PEG) unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula y un compuesto fluorescente encapsulado de manera covalente dentro del núcleo de la nanopartícula; (b) un ligando dirigido que se une al receptor de folato (FR), en el que el ligando dirigido comprende ácido fólico, o un derivado de unión al receptor de folato del mismo, y en el que el ligando dirigido está unido a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador; (c) un conjugado de enlazador-carga útil, en el que la carga útil es un agente citotóxico; en el que el conjugado enlazador-carga útil está unido a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador; en el que el agente citotóxico se libera tras la escisión del enlazador; en el que el enlazador en el conjugado de enlazador-carga útil es un enlazador escindible por proteasa; y en el que el NDC tiene un diámetro promedio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm, por ejemplo, entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 8 nm, o entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 6 nm. El agente citotóxico puede ser exatecán.

[0011] En los NDC de la presente divulgación, la relación promedio de nanopartículas con respecto a carga útil puede variar de 1 a 80, tal como de 1 a 21 (por ejemplo, de 1 a 13, o de 1 a 12) y la relación promedio de nanopartículas con respecto a ligando dirigido puede variar de 1 a 50, tal como de 1 a 25 (por ejemplo, de 1 a 11).

[0012] Los NDC de la presente divulgación pueden tener un diámetro promedio de entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm, por ejemplo, entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 8 nm, entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 8 nm, o entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 6 nm.

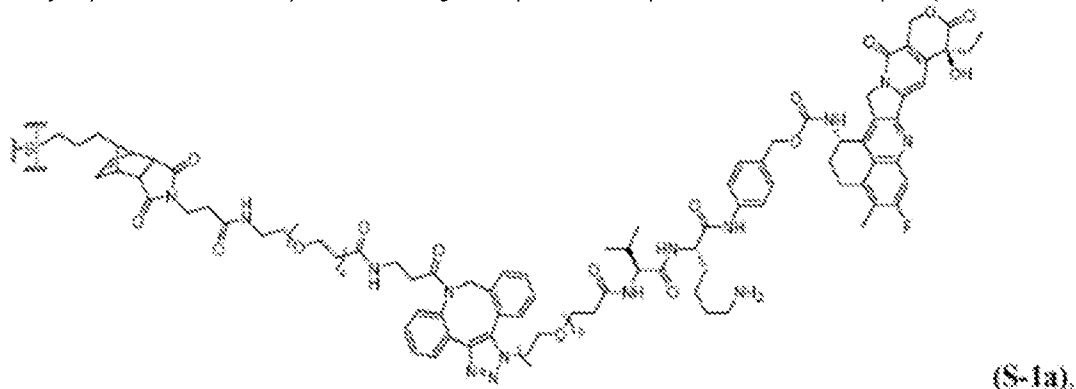
[0013] Los NDC de la presente divulgación pueden comprender cualquier colorante adecuado o compuesto detectable, tal como un compuesto fluorescente. Por ejemplo, en un NDC de la presente divulgación, el compuesto fluorescente puede ser Cy5. El compuesto fluorescente puede estar encapsulado dentro de la nanopartícula (por ejemplo, unido de manera covalente al núcleo de sílice). Los NDC de la presente divulgación pueden comprender un ligando dirigido que se une a un receptor de folato (FR). El ligando dirigido puede comprender ácido fólico o un derivado del mismo. Debe entenderse que "ácido fólico" puede abarcar una amida o un éster de ácido fólico, por ejemplo, el ácido fólico puede conjugarse con la nanopartícula (o grupo espaciador) en su extremo carboxilo mediante un enlace amida o éster. Por ejemplo, "ácido fólico" puede referirse a la amida de ácido fólico presente en el NDC de ejemplo ilustrado en la figura 1.

[0014] Los NDC de la presente divulgación pueden comprender la estructura (S-1):



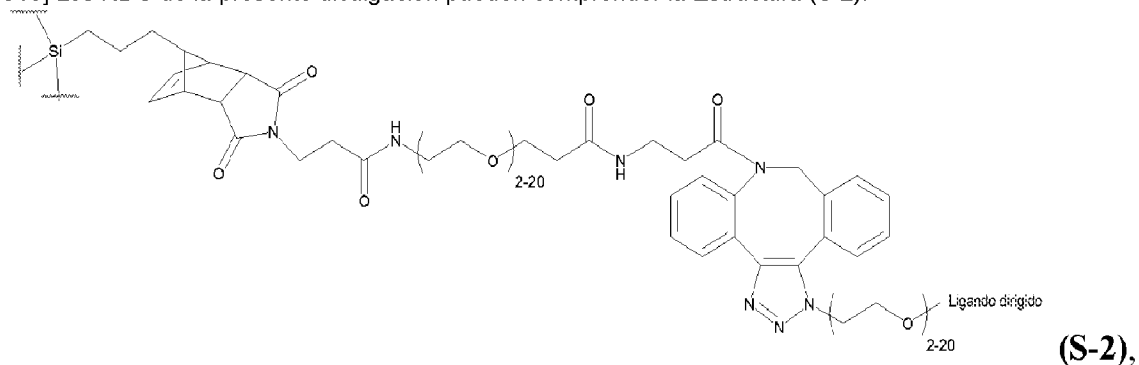
5 en la que la carga útil comprende exatecán; el enlazador comprende un enlazador escindible por proteasa; y el átomo de silicio es parte de la nanopartícula.

[0015] Por ejemplo, los NDC de la presente divulgación pueden comprender la estructura (S-1a):



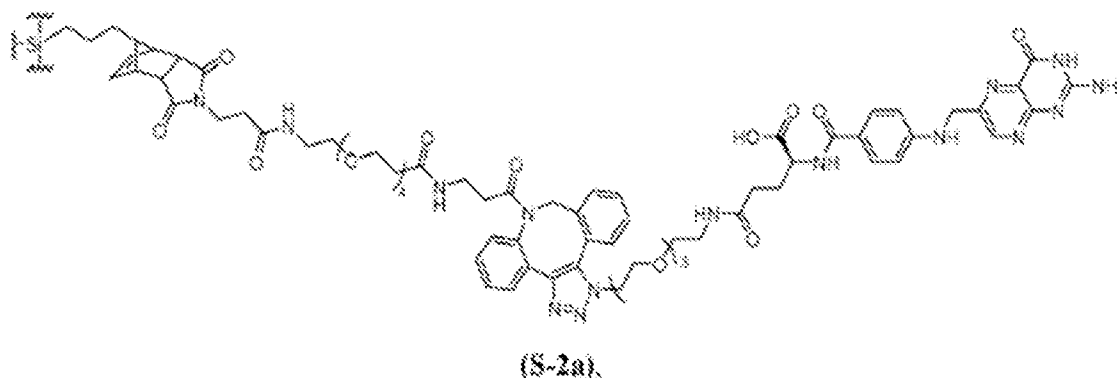
10 en la que el átomo de silicio es parte de la nanopartícula.

[0016] Los NDC de la presente divulgación pueden comprender la Estructura (S-2):



15 en la que el Ligando Dirigido es ácido fólico, o un derivado de unión al receptor de folato del mismo, y el átomo de silicio es parte de la nanopartícula.

20 [0017] Por ejemplo, los NDC de la presente divulgación pueden comprender la estructura (S-2a):

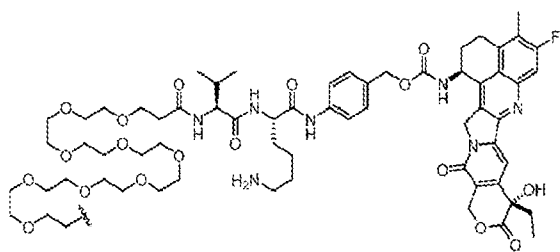


en la que el átomo de silicio es parte de la nanopartícula.

5 [0018] Los NDC de la presente divulgación pueden comprender una combinación de Estructuras **(S-1)** y **(S-2)**. Por ejemplo, los NDC pueden comprender tanto la Estructura **(S-1a)** como la Estructura **(S-2a)**, por ejemplo, tal como se representa en la figura 1. Las estructuras S-1, S-1a, S-2 o S-2a pueden estar presentes en el NDC en cualquier relación deseada, por ejemplo, en una relación descrita en el presente documento.

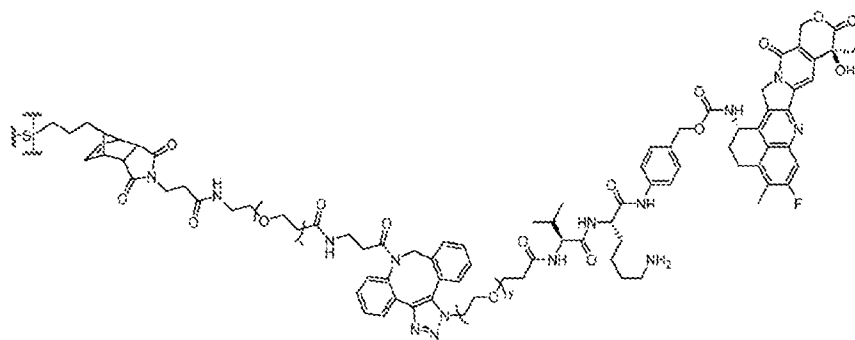
10 [0019] La divulgación también se refiere a NDC que comprenden una nanopartícula que comprende un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo; polietilenglicol (PEG) unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula; un compuesto fluorescente encapsulado de manera covalente dentro del núcleo de la nanopartícula; un ligando dirigido, en el que el ligando dirigido es ácido fólico; un conjugado enlazador-carga útil, en el que el conjugado enlazador-carga útil es un enlazador escindible por proteasa que es capaz de experimentar hidrólisis en un extremo C-terminal tras la unión de la proteasa liberando de este modo la carga útil de la nanopartícula, en el que la proteasa comprende una serina proteasa o una cisteína proteasa, en el que la carga útil en el conjugado enlazador-carga útil es exatecán o un análogo de exatecán; y en el que el compuesto fluorescente es Cy5.

20 [0020] La divulgación también se refiere a NDC que comprenden una nanopartícula que comprende un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo; polietilenglicol (PEG) unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula; un colorante Cy5 encapsulado de manera covalente dentro del núcleo de la nanopartícula; un ligando dirigido que se une al receptor de folato, en el que el ligando dirigido es ácido fólico, y en el que el ligando dirigido está unido a la nanopartícula indirectamente a través de un grupo espaciador; un conjugado de enlazador-carga útil, en el que el conjugado de enlazador-carga útil está unido a la nanopartícula indirectamente a través de un grupo espaciador, en el que el conjugado de enlazador-carga útil comprende un compuesto que comprende la estructura



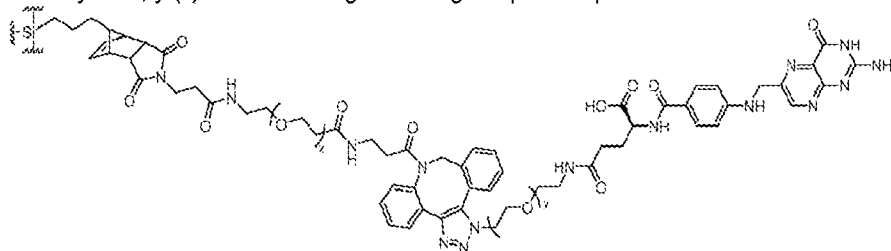
30 y en el que el NDC tiene un diámetro promedio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm (por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 nm).

35 [0021] La presente divulgación también se refiere a conjugados de nanopartículas y fármacos (NDC) que comprenden: (a) una nanopartícula de sílice que comprende un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo; y polietilenglicol (PEG) unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula; (b) un resto de exatecán-enlazador que comprende la estructura de Fórmula (NP-3):



(NP-3).

en la que x es 4 e y es 9; y (c) un resto de ligando dirigido que comprende la estructura de Fórmula (NP-2)



(NP-2).

5

en la que x es 4 e y es 3, y en la que el resto de exatecán-enlazador y el resto de ligando dirigido están conjugados cada uno a una superficie de la nanopartícula. El NDC puede comprender un colorante fluorescente (por ejemplo, Cy5) encapsulado de manera covalente dentro del núcleo de la nanopartícula.

10

[0022] La presente divulgación también proporciona un procedimiento para tratar un cáncer que expresa el receptor de folato (FR) (por ejemplo, un tumor que expresa el receptor de folato (FR)), que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una NDC descrito en el presente documento. El procedimiento puede incluir la administración de NDC al sujeto que los necesita por vía intravenosa. En los procedimientos de la presente divulgación, el sujeto puede tener un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama (que incluye, por ejemplo, cáncer de mama HER2+, cáncer de mama HR+, cáncer de mama HR- cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica) y leucemia mielógena crónica (CML). Los NDC de la presente divulgación también se pueden usar para dirigirse a macrófagos asociados a tumores, que se pueden usar como un medio para modificar el estado inmunológico de un tumor en un sujeto. Los NDC de la presente divulgación se pueden usar en un procedimiento para tratar un tumor sólido avanzado, recurrente o refractario.

25

[0023] La presente divulgación da a conocer el uso de un NDC para tratar un cáncer que expresa el receptor de folato (FR) (por ejemplo, un tumor que expresa el receptor de folato (FR)). El uso puede incluir la administración de NDC por vía intravenosa al sujeto que los necesita. En el uso del NDC, el sujeto puede tener un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama (que incluye, por ejemplo, cáncer de mama HER2+, cáncer de mama HR+, cáncer de mama HR- cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica) y leucemia mielógena crónica (CML). En el uso del NDC, el cáncer puede ser un tumor sólido avanzado, recurrente o refractario.

30

35

[0024] La presente divulgación da a conocer NDC para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa el receptor de folato (FR) (por ejemplo, un tumor que expresa el receptor de folato (FR)). El uso en la fabricación de un medicamento puede incluir la administración de NDC por vía intravenosa al sujeto que los necesita. El uso en la fabricación de un medicamento puede incluir la administración de NDC a un sujeto, en el que el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama (que incluye, por ejemplo, cáncer de mama HER2+, cáncer de mama HR+, cáncer de mama HR- cáncer de mama triple negativo), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo,

40

45

cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica) y leucemia mielógena crónica (CML). Los NDC de la presente divulgación se pueden usar en la fabricación de un medicamento para tratar tumores sólidos avanzados, recurrentes o refractarios.

[0025] La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un NDC y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden usar para tratar un cáncer que expresa el receptor de folato (FR) (por ejemplo, un tumor que expresa el receptor de folato (FR)).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026] La **figura 1** ilustra una estructura química representativa del conjugado de nanopartícula-fármaco (NDC).

La **Figura 2** representa un diagrama de flujo para la síntesis de una nanopartícula funcionalizada de ejemplo (C'Dot funcionalizado con dibenzociclooctino (DBCO)).

La **figura 3** representa un diagrama de flujo para la síntesis de un NDC de ejemplo (FA-CDC) que comprende un C'Dot funcionalizado con ácido fólico (FA) y exatecán.

La **Figura 4** ilustra un espectro de absorbancia UV-Vis representativo de una nanopartícula funcionalizada de ejemplo (C'Dot funcionalizado con DBCO). El pico de absorción a 648 nm corresponde al colorante Cy5 que está encapsulado de manera covalente dentro del núcleo del C'Dot. Los picos de absorción entre aproximadamente 270 y 320 nm corresponden a grupos DBCO.

La **Figura 5** ilustra un espectro de absorbancia UV-Vis representativo de un NDC de ejemplo (C'Dot funcionalizado con ácido fólico (FA) que comprende exatecán (FA-CDC)). El pico de absorción a 648 nm corresponde al colorante Cy5 que está encapsulado de manera covalente dentro del núcleo de C'Dot. Los picos de absorción entre aproximadamente 330 y 400 nm corresponden al exatecán.

La **Figura 6** representa una curva de correlación de espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, *fluorescence correlation spectroscopy*) de un NDC de ejemplo (C'Dot conjugado con exatecán-enlazador funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC)) que está ajustado con una función de correlación FCS monomodal. El diámetro hidrodinámico promedio se obtuvo ajustando la curva de correlación FCS.

La **Figura 7** representa un cromatograma que muestra la elución de un NDC de ejemplo (C'Dot conjugado con exatecán-enlazador funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC)) mediante cromatografía de permeación en gel (GPC, *gel permeation chromatography*). La elución de FA-CDC (línea rayada bajo la curva) se compara con el tiempo de elución de patrones de proteínas con peso molecular variable (línea discontinua).

La **Figura 8** representa un cromatograma de HPLC en fase inversa de un NDC de ejemplo purificado (C'Dot conjugado con exatecán-enlazador funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC)) a 330 nm. Esta longitud de onda se puede utilizar para monitorizar tanto el FA-CDC como las impurezas que puedan estar presentes después de la síntesis o debido a cualquier degradación del NDC.

La **figura 9** ilustra los espectros de absorbancia UV-Vis de un conjugado de carga útil de exatecán de ejemplo. Exatecán tiene un máximo de absorción alrededor de 360 nm.

Las **figuras 10A-10B** ilustran cromatografías de HPLC representativas que proporcionan análisis de un NDC de ejemplo preparado según el Ejemplo 3, que está conjugado con ácido fólico como ligando dirigido y con exatecán como carga útil (NDC preparado usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202, del Ejemplo 1). La

figura 10A representa una cromatografía de HPLC representativa a 360 nm del NDC no escindido que muestra un único pico en el tiempo de elución de alrededor de 6,3 minutos que corresponde a la carga útil no liberada retenida en el NDC. La **figura 10B** representa una cromatografía de HPLC representativa a 360 nm de un NDC escindido, que muestra un pico adicional en el tiempo de elución alrededor de 3 a 4 minutos que corresponde a la carga útil de exatecán liberada. El área bajo la curva (AUC) de la carga útil liberada y la carga útil retenida se utilizaron para calcular el porcentaje de carga útil liberada.

Las **figuras 11A-11C** son gráficos que ilustran un análisis de liberación de fármaco de NDC de ejemplo cargados con ácido fólico como ligando dirigido y conjugados de exatecán-enlazador escindible por proteasa (catepsina-B), en diferentes puntos temporales después de la incubación con catepsina-B. La **figura 11A** representa la cromatografía de HPLC de fase inversa de NDC B en diferentes puntos de tiempo después de la incubación con catepsina-B. La **figura 11B** representa la cromatografía de HPLC de fase inversa de NDC C en diferentes puntos de tiempo después de la incubación con catepsina-B. La **figura 11C** representa la cromatografía de HPLC de fase inversa de NDC D (preparado usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202, del Ejemplo 1) en diferentes puntos de tiempo después de la incubación con catepsina-B.

Las **figuras 12A-12C** son gráficos que ilustran una cinética de liberación de fármaco de NDC de ejemplo cargados con conjugados de exatecán-enlazador escindible con proteasa (catepsina-B), en diferentes puntos de tiempo después de la incubación con la enzima catepsina-B, y representan el tiempo para que la mitad de las cargas útiles sean liberadas, es decir, $T_{1/2}$. La **figura 12A** representa el $T_{1/2}$ como 2,9 horas para NDC B. La **figura 12B** representa el $T_{1/2}$ como 2,6 horas para NDC C. La **figura 12C** representa el $T_{1/2}$ como 1,4 horas para NDC D.

La **figura 13** representa la unión competitiva de un NDC de ejemplo (C'Dot conjugado con fármaco-enlazador funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC)) en una línea celular FR alfa positiva (KB), en comparación con ácido fólico libre.

La **figura 14** representa la citometría de flujo de NDC representativos (dos C'Dot conjugados con fármaco-enlazador funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC)) en línea celular KB con densidad de ligando de ácido fólico variada (ya sea un promedio de 0, 12 o 25 moléculas de ácido fólico por nanopartícula). El precursor del conjugado de exatecán-enlazador usado para preparar cada NDC usado en el estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202). El bloqueo en el grupo de bloqueo se logró utilizando 1 mM de ácido fólico libre. Como grupo de control negativo se utilizó un CDC sin ácido fólico, pero con la misma cantidad de conjugado de exatecán-enlazador.

La **figura 15** representa la citometría de flujo de NDC representativos (tres C'Dots conjugados con fármaco-enlazador funcionalizados con ácido fólico (FA) (FA-CDC) en una línea celular KB con relación variada de fármaco con respecto a partícula (DPR). El precursor de conjugado de exatecán-enlazador utilizado para preparar los NDC utilizados en el estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202). El bloqueo en el grupo bloqueador se logró usando 1 mM de ácido fólico libre. Todos los FA-CDC comprenden entre 12 y 22 restos de ácido fólico. Los FA-CDC con una relación alta de fármaco con respecto a partícula (DPR) comprenden entre 35 y 50 grupos conjugados de exatecán-enlazador. Los FA-CDC con una DPR media comprenden entre 17 y 25 grupos conjugados de exatecán-enlazador. Los FA-CDC con una DPR baja tienen entre 5 y 10 grupos de conjugados de exatecán-enlazador. Se usaron CDC sin ácido fólico y de 17 a 25 enlazadores-fármaco como grupo de control negativo.

La **Figura 16** representa la citometría de flujo de un NDC representativo (C'Dot conjugado con enlazador-fármaco funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC)) a 1 nM que se preincubó con cantidades variadas de plasma humano durante 24 horas. El bloqueo en el grupo bloqueador se logró con 1 mM de ácido fólico libre. El precursor del conjugado de exatecán-enlazador usado para preparar el NDC usado en el estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202), para proporcionar un promedio de 25 moléculas de exatecán por nanopartícula. El número promedio de ligandos de ácido fólico por nanopartícula fue 15. Se utilizó CDC sin ácido fólico, pero con la misma cantidad de enlazadores de fármacos como grupo de control negativo.

La **figura 17** muestra las imágenes de microscopía confocal de un NDC de ejemplo (C'Dot conjugado con enlazador-fármaco funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC), mostrado en los ejemplos como NDC B) en las líneas celulares KB (+++++) y TOV-112D (-) a 1 hora y 24 horas. El bloqueo en el grupo de bloqueo se logró utilizando 0,1 mM de ácido fólico libre. El número promedio de ligandos de ácido fólico en FA-CDC (NDC B) es 12, y el número de conjugados de exatecán-enlazador es 40). El lisosoma se tiñó usando LysoTracker® Green, que es un colorante verde fluorescente para marcar y rastrear orgánulos ácidos en células vivas. Con imágenes en color (no mostradas), el CDC aparece rojo, el lisosoma aparece verde y el núcleo aparece azul, debido a la fluorescencia.

La **figura 18** es una imagen que compara la imagen microscópica confocal del apilamiento Z de esferoides tumorales KB tratados con un NDC dirigido al receptor de folato (FR) de ejemplo (NDC D, preparado según el Ejemplo 3 usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202), una nanopartícula dirigida a FR libre sin carga útil (FA-C'Dot), un ADC dirigido a FR o el correspondiente anticuerpo dirigido a FR sin carga útil, a 37 °C durante 4 horas, seguido de lavado. Barra de escala: 200 µm.

La **figura 19A** representa una imagen PET/CT con proyección de intensidad máxima (MIP) representativa de ratones desnudos sanos inyectados con ⁸⁹Zr-DFO-FA-CDC 1, 24, 48 y 72 horas después de la inyección.

La **figura 19B** ilustra el patrón de biodistribución de ⁸⁹Zr-DFO-FA-CDC en ratones desnudos sanos a las 2 y 24 horas después de la inyección (n = 3). El precursor del conjugado de exatecán-enlazador usado para preparar el NDC usado en el estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202); el número promedio de ligandos de ácido fólico en cada NDC (FA-CDC) es 12; y el número promedio de conjugados de exatecán-enlazador en cada NDC es 25.

Las **figuras 20A-20F** representan los estudios de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* de seis NDC dirigidos a receptores de folato de ejemplo NDC (NDC A-F) en ratones portadores de tumores KB (n=7). NDC-A comprende aproximadamente 19 grupos conjugados de fármaco-enlazador y aproximadamente 18 ligandos de ácido fólico por nanopartícula. NDC B comprende aproximadamente 25 grupos de fármaco-enlazador y aproximadamente 15 ligandos de ácido fólico por nanopartícula. NDC C comprende aproximadamente 19 grupos de conjugados de fármaco-enlazador y aproximadamente 13 ligandos de ácido fólico por nanopartícula. NDC D comprende aproximadamente 25 grupos de conjugados de fármaco-enlazador y aproximadamente 12 ligandos de ácido fólico por nanopartícula. NDC E comprende aproximadamente 17 grupos de conjugados de fármaco-enlazador y aproximadamente 17 ligandos de ácido fólico por nanopartícula. NDC F comprende aproximadamente 23 grupos de conjugados de fármaco-enlazador y aproximadamente 20 ligandos de ácido fólico por nanopartícula.

Las **figuras 21A-21B** representan las curvas IC₅₀ de un NDC de ejemplo en células KB resistentes a irinotecán y sin tratar (vírgenes), en comparación con irinotecán no conjugado. La **figura 21A** muestra las curvas IC₅₀ de irinotecán en células KB regulares (células sin tratar) y en células KB tratadas cuatro veces con irinotecán (células resistentes a irinotecán). La **figura 21B** muestra las curvas IC₅₀ del NDC de ejemplo en las células sin tratar y en las células resistentes a irinotecán. El precursor del conjugado de exatecán-enlazador usado para preparar el NDC de ejemplo de este estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202).

Las **figuras 22A-22B** representan las curvas IC₅₀ de un NDC de ejemplo en células KB resistentes a exatecán y sin tratar, en comparación con exatecán no conjugado. La **figura 21A** muestra las curvas de IC₅₀ de exatecán en células KB regulares (células sin tratar) y en células KB tratadas cuatro veces o siete veces con exatecán (células resistentes a exatecán). La **figura 22A** muestra las curvas IC₅₀ del NDC de ejemplo en las células sin tratar y en las células resistentes a exatecán (pretratamiento de 4 ciclos y 7 ciclos). El precursor del conjugado de exatecán-enlazador usado para preparar el NDC de ejemplo de este estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202).

La **figura 23** proporciona una tabla que demuestra la citotoxicidad de NDC dirigidos a receptores de folato ("FA-CDC") de ejemplo con relaciones variables de fármaco con respecto a partícula (DPR), en diferentes líneas celulares cancerosas que sobreexpresan FR-alfa, en comparación con exatecán no conjugado. El precursor del conjugado de exatecán-enlazador usado para preparar los NDC de ejemplo de este estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto

202).

La **figura 24** proporciona una tabla que muestra la citotoxicidad de un NDC de ejemplo en varios esferoides tumorales resistentes al platino derivados de pacientes en 3D. El precursor del conjugado de exatecán-enlazador usado para preparar el NDC de ejemplo de este estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202).

Las **figuras 25A-25D** proporcionan histogramas de citometría de flujo que demuestran la capacidad de reconocimiento del receptor alfa de folato (FR) específico de una NDC dirigido a FR de ejemplo (preparado según el Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1) tanto a IGROV-1 como a IGROV-1 (cáncer de ovario humano FR alfa positivo) y la línea celular de AML MV4;11 diseñada que sobreexpresa FR alfa. La **figura 25A** es el histograma de citometría de flujo del NDC dirigido a FR (10 nM) y NDC no dirigido (control negativo; 10 nM) en la línea celular IGROV-1. La **figura 25B** es el histograma de citometría de flujo del anticuerpo anti-FR alfa-PE y del anticuerpo isotipo-PE (control negativo) en la línea celular IGROV-1. La **figura 25C** es el histograma de citometría de flujo del NDC dirigida a FR (10 nM) y el NDC no dirigido (control negativo; 10 nM) en la línea celular de AML MV4;11 diseñada que sobreexpresa FR alfa. La **figura 25D** es el histograma de citometría de flujo del anticuerpo anti-FR alfa-PE y del anticuerpo isotipo-PE (control negativo) en la línea celular de AML MV4; 11 diseñada que sobreexpresa FR alfa.

Las **figuras 26A-26B** son gráficos que ilustran la actividad citotóxica *in vitro* de un NDC de ejemplo (preparado según el Ejemplo 3 usando el precursor de conjugado exatecán-enlazador del Ejemplo 1, Compuesto 202) en la línea celular IGROV-1 (cáncer de ovario humano FR alfa positivo) (**Figura 26A**) y línea celular de AML MV4; 11 diseñada que sobreexpresa FR alfa (**figura 26B**) usando NDC no dirigido como control negativo.

La **figura 27** es un gráfico que proporciona el cambio de peso corporal de ratones con AML que sobreexpresan FR alfa a lo largo del tiempo después del tratamiento con solución salina normal o un NDC de ejemplo (preparado según el Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado exatecán-enlazador del Ejemplo 1, Compuesto 202) en tres regímenes de dosis diferentes (0,33 mg/kg, Q3Dx6 (indicado con cuadrados); 0,50 mg/kg, Q3Dx3 (indicado con rombos); o 0,65 mg/kg, Q3Dx3 (indicado con triángulos)).

La **figura 28** proporciona imágenes de imágenes de bioluminiscencia (BLI) *in vivo* de ratones con AML que sobreexpresan FR alfa tratados con solución salina normal o un NDC de ejemplo (preparado según el Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado exatecán-enlazador del Ejemplo 1, Compuesto 202) en tres regímenes de dosis diferentes (0,33 mg/kg, Q3Dx6); 0,50 mg/kg, Q3Dx3; o 0,65 mg/kg, Q3Dx3).

La **Figura 29** es un gráfico que proporciona el análisis cuantitativo de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* de ratones con AML que sobreexpresan FR alfa tratados con solución salina normal o un NDC de ejemplo (preparado según el Ejemplo 1, usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador del Ejemplo 1, Compuesto 202) en tres regímenes de dosis diferentes (0,33 mg/kg, Q3Dx6); 0,50 mg/kg, Q3Dx3; o 0,65 mg/kg, Q3Dx3).

La **figura 30** es un gráfico que indica la leucemia detectada en la aspiración de médula ósea el día 42 después de la inyección de células leucémicas, obtenida de ratones tratados con solución salina normal o un NDC de ejemplo (preparado según el Ejemplo 3, usando el conjugado de precursor de exatecán-enlazador del Ejemplo 1, Compuesto 202) en tres regímenes de dosis diferentes (0,33 mg/kg, Q3Dx6); 0,50 mg/kg, Q3Dx3; o 0,65 mg/kg, Q3Dx3).

La **figura 31** es una ilustración de la línea de tiempo utilizada para preparar ratones AML que sobreexpresan FR alfa y dosificar a los ratones con un NDC de ejemplo (preparado según el Ejemplo 3, usando el precursor del conjugado exatecán-enlazador del Ejemplo 1, Compuesto 202) en tres regímenes de dosis diferentes (0,33 mg/kg, Q3Dx6); 0,50 mg/kg, Q3Dx3; o 0,65 mg/kg, Q3Dx3), y la obtención de imágenes de los ratones con imágenes bioluminiscentes (BLI). Cada día de dosificación se indica con un triángulo (es decir, los días 46, 49 y 52 para todos los grupos de dosis, y también los días 55, 58 y 62 para el grupo de dosis de 0,33 mg/kg Q3Dx6).

La **figura 32** muestra las imágenes de microscopía confocal de un NDC de ejemplo (C'Dot conjugado con fármaco-enlazador funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC), mostrado en los ejemplos como NDC D, preparado usando el precursor 202 del conjugado de enlazador-exatecán) en líneas celulares KB (+++++) y TOV-112D (-) después de 1 hora y 24 horas. El bloqueo en el grupo de bloqueo se logró utilizando 0,1 mM de ácido fólico libre. El lisosoma se tiñó usando LysoTracker® Green, que es un colorante verde fluorescente para marcar y rastrear orgánulos ácidos en células vivas. Con imágenes en color (no mostradas), el CDC aparece rojo, el lisosoma aparece verde y el núcleo aparece azul, debido a la fluorescencia.

Las **figuras 33A-33B** son gráficos que demuestran la estabilidad de NDC de ejemplo preparados usando procedimientos descritos en el presente documento. La **figura 33A** compara la estabilidad de un NDC producido usando una nanopartícula funcionalizada a base de dieno (es decir, basada en el protocolo descrito en el Ejemplo 3), y un NDC comparativo producido usando una nanopartícula funcionalizada a base de amina, en suero humano a 37 °C, durante 7 días. La **figura 33B** compara la estabilidad del NDC producido usando un precursor bifuncional a base de dieno y el NDC comparativo producido usando un precursor bifuncional a base de amina en suero de ratón a 37 °C, durante 7 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0027] En el presente documento se describen conjugados de nanopartículas y fármacos (NDC), que comprenden una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula de sílice, tal como una nanopartícula multimodal a base de sílice) que permite la conjugación con ligandos dirigidos y con cargas útiles citotóxicas, para la detección, prevención, monitorización y/o tratamiento de una enfermedad, tal como cáncer.

[0028] La presente divulgación da a conocer composiciones y procedimientos para usar un conjugado de nanopartícula y fármaco (NDC) que comprende: una nanopartícula; un ligando dirigido que se une a un receptor de folato (por

ejemplo, ácido fólico o un derivado o sal del mismo), y un conjugado de enlazador-carga útil, que puede comprender exatecán y un enlazador escindible por proteasa.

[0029] La conjugación de ligandos dirigidos y conjugados de fármaco-enlazador con la nanopartícula se puede lograr mediante una reacción de "química clic" altamente eficiente, que es rápida, sencilla de realizar, versátil y da como resultado altos rendimientos del producto. La carga útil puede ser un agente citotóxico que comprende exatecán, o una sal o análogo del mismo, que está unido a la nanopartícula mediante un grupo enlazador escindible. El grupo enlazador escindible puede escindir-se cuando el NDC se internaliza en una célula cancerosa (por ejemplo, en una célula tumoral), tal como en el endosoma o compartimento lisosomal de la célula, provocando la liberación del agente citotóxico activo de los NDC. La escisión puede ser catalizada por una proteasa (por ejemplo, cathepsina B).

[0030] Los NDC descritos en el presente documento proporcionan una plataforma óptima para la administración de fármacos, debido en parte a sus propiedades físicas. Por ejemplo, los NDC comprenden nanopartículas que tienen un diámetro ultrapequeño (por ejemplo, con un diámetro promedio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm, tal como entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 8 nm) y se benefician de efectos mejorados de permeabilidad y retención (EPR, *enhanced permeability and retention*) en microambientes tumorales, manteniendo al mismo tiempo la depuración y las propiedades farmacocinéticas deseadas.

[0031] Los NDC descritos en el presente documento tienen ciertas ventajas sobre otras plataformas de administración de fármacos (por ejemplo, ADC, tales como ADC dirigidos a FR y fármacos de molécula pequeña dirigidos a FR (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos)). Por ejemplo, un único NDC de la presente divulgación puede incluir hasta aproximadamente 80 moléculas de fármaco en cada nanopartícula (por ejemplo, 80 moléculas de exatecán). Por el contrario, en los ADC convencionales, sólo se pueden unir aproximadamente de 4 a 8 moléculas terapéuticas/fármacos al anticuerpo, y los fármacos de molécula pequeña convencionales dirigidos a FR se limitan a una única molécula terapéutica/fármaco. Por lo tanto, los NDC descritos en el presente documento pueden transportar al menos 10 veces más moléculas de fármaco en NDC, en relación con las plataformas de administración de fármacos convencionales, y administrar una carga de fármaco relativamente mayor a las células.

[0032] Aunque las plataformas de administración de fármacos dirigidas al receptor de folato (FR) convencionales, tales como ADC y agentes quimioterapéuticos de pequeño peso molecular dirigidos a FR, normalmente muestran una alta potencia en células cancerosas con un alto nivel de expresión del receptor, su eficacia en células cancerosas con un nivel de expresión de FR medio o bajo es limitado. Por el contrario, los NDC de la presente divulgación pueden dirigirse eficazmente a células cancerosas con niveles de expresión de FR tanto altos como bajos y proporcionar una terapia potente para cánceres que tienen una expresión baja de FR (ver, por ejemplo, la Figura 23 y el ensayo asociado descrito en los Ejemplos).

[0033] Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular del mecanismo, se cree que, debido a que los NDC divulgados en el presente documento pueden incluir múltiples ligandos dirigidos a FR en una sola nanopartícula, existe un efecto multivalente o de avidéz en la unión a varios FR en la superficie celular. Por el contrario, un solo ADC generalmente solo puede unirse a hasta dos FR en la superficie celular, y un solo fármaco de quimioterapia dirigido a FR solo puede unirse a un FR en la superficie celular. Por lo tanto, el efecto multivalente de los NDC dirigidos a FR de la presente divulgación puede mejorar de manera significativa la unión de NDC a células que expresan FR, lo que conduce a una eficacia de reconocimiento y resultados terapéuticos mejorados. Este efecto multivalente también puede hacer que los NDC de la presente divulgación sean adecuados para tratar cánceres que tienen una baja expresión de FR, que no pueden tratarse de manera eficaz usando plataformas convencionales de administración de fármacos dirigidos a FR, tales como ADC o fármacos de quimioterapia dirigidos a FR.

[0034] La eficacia de los ADC en el tratamiento de tumores sólidos suele estar muy limitada por su escasa penetración en el tumor. Por el contrario, los NDC dirigidos a FR descritos en el presente documento exhiben una penetración tumoral altamente efectiva, lo que permite la administración de agentes terapéuticos en todo el tumor después de la administración, lo que mejora los resultados terapéuticos en el tratamiento de tumores sólidos, en relación con el uso de ADC.

[0035] Los NDC de la presente divulgación tienen un tamaño más pequeño que las plataformas de administración de fármacos convencionales, tales como los ADC. En particular, los NDC de la presente divulgación son más pequeños que el corte de tamaño de partícula para la depuración renal, lo que permite que los NDC sean eliminables por vía renal. Como resultado, los NDC que se administran a un sujeto pero que no entran en una célula cancerosa (es decir, las NDC no dirigidos) pueden eliminarse rápidamente del cuerpo mediante eliminación renal. Este enfoque de objetivo y/o depuración reduce la toxicidad de los NDC en comparación con las plataformas de administración de fármacos convencionales, tales como los ADC, y previene la acumulación indeseable de los NDC (o sus cargas útiles) en tejidos u órganos sanos. Los NDC de la presente divulgación exhiben una biodistribución mejorada con respecto a las plataformas de administración de medicamentos convencionales, tales como las ADC, lo que resulta en una reducción de los efectos secundarios y la toxicidad.

Nanopartículas

[0036] La presente divulgación se refiere a NDC que comprenden una nanopartícula, tal como una nanopartícula de sílice. La nanopartícula puede comprender un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo. De manera alternativa, la nanopartícula puede tener sólo el núcleo y ninguna cubierta. El núcleo de la nanopartícula puede contener el producto de reacción de un compuesto fluorescente reactivo y un compuesto organosilano correactivo. Por ejemplo, el núcleo de la nanopartícula puede contener el producto de reacción de un compuesto fluorescente reactivo y un compuesto organosilano correactivo, y sílice. En aspectos preferidos de la presente divulgación, la nanopartícula es una partícula de núcleo-cubierta.

[0037] El diámetro del núcleo puede ser de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 25 nm, de aproximadamente 0,8 nm a aproximadamente 15 nm, o de aproximadamente 1 nm hasta aproximadamente 8 nm. Por ejemplo, el diámetro del núcleo puede ser de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 8 nm, o de 3 nm a aproximadamente 6 nm, por ejemplo, el diámetro del núcleo puede ser de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 4 nm, de aproximadamente 4 nm a aproximadamente 5 nm, de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 6 nm, de aproximadamente 6 nm a aproximadamente 7 nm, o de aproximadamente 7 nm a aproximadamente 8 nm.

[0038] La cubierta de la nanopartícula puede ser el producto de reacción de un compuesto formador de sílice, tal como un ortosilicato de tetraalquilo, por ejemplo ortosilicato de tetraetilo (TEOS). La cubierta de la nanopartícula puede tener una variedad de capas. Por ejemplo, la cubierta de sílice puede tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 capas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 capas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 capas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 capas. Por ejemplo, la cubierta de sílice puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 capas. El grosor de la cubierta puede variar desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 90 nm, desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 40 nm, desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 20 nm, desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 10 nm, o desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 5 nm, por ejemplo, aproximadamente 1 nm, aproximadamente 2 nm, aproximadamente 3 nm, aproximadamente 4 nm o aproximadamente 5 nm. Por ejemplo, el grosor de la cubierta de sílice puede ser de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 2 nm. La cubierta de sílice de la nanopartícula puede cubrir sólo una parte de la nanopartícula o la partícula completa. Por ejemplo, la cubierta de sílice puede cubrir de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 100 por cien, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 80 por ciento, de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 60 por ciento, o de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 50 por ciento de la nanopartícula. Por ejemplo, la cubierta de sílice puede cubrir entre aproximadamente un 50 y aproximadamente un 100 por ciento. La cubierta de sílice puede ser sólida, es decir, sustancialmente no porosa, mesoporosa, semiporosa, o la cubierta de sílice puede ser porosa. La nanopartícula de sílice puede ser sólida, es decir, sustancialmente no porosa, mesoporosa, semiporosa, o la nanopartícula de sílice puede ser porosa. En algunas realizaciones, la nanopartícula es una nanopartícula no mesoporosa, por ejemplo, una nanopartícula de sílice no mesoporosa, tal como una nanopartícula de núcleo-cubierta de sílice no mesoporosa.

[0039] La superficie de la nanopartícula se puede modificar para incorporar al menos un grupo funcional. Se puede unir un polímero orgánico a la nanopartícula y se puede modificar para incorporar al menos un grupo funcional mediante cualquier técnica conocida en el sector. Los grupos funcionales pueden incluir, pero sin limitación a los mismos, dibenzociclooctino (DBCO), maleimida, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), un dieno (por ejemplo, ciclopentadieno), una amina o un tiol. Por ejemplo, un grupo bifuncional que comprende un silano en un extremo y un DBCO, maleimida, éster de NHS, dieno (por ejemplo, ciclopentadieno), amina o tiol en el otro extremo, puede condensarse sobre la superficie de la nanopartícula de sílice a través del grupo silano. La incorporación del grupo funcional también se puede lograr mediante técnicas conocidas en el sector, tales como el uso de "química clic", reacciones de acoplamiento de amida, adiciones 1,2, tales como una reacción de adición de Michael o cicloadición de Diels-Alder (2+4). Esta incorporación permite la unión de diversos ligandos dirigidos, agentes de contraste y/o agentes terapéuticos a la nanopartícula.

[0040] Los polímeros orgánicos que pueden unirse a la nanopartícula incluyen, pero sin limitación a los mismos, polietilenglicol (PEG), polilactato, ácidos polilácticos, azúcares, lípidos, ácido poliglútamico (PGA), ácido poliglicólico, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), acetato de polivinilo (PVA) y combinaciones de los mismos. En aspectos preferidos de la presente divulgación, el polímero orgánico es polietilenglicol (PEG).

[0041] En aspectos preferidos de la presente divulgación, la superficie de la nanopartícula está funcionalizada. Por ejemplo, la superficie de la nanopartícula puede tener grupos funcionales distintos de los resultantes de la síntesis de las nanopartículas (por ejemplo, grupos -OH (resultantes de grupos Si-OH terminales en una superficie de nanopartícula) y grupos PEG (resultantes de grupos Si-PEG en la superficie de la nanopartícula). Dicha funcionalización y procedimientos de funcionalización son conocidos en la técnica.

[0042] La nanopartícula puede comprender una superficie sin poros y una superficie con poros. En una realización, al menos una parte de la superficie sin poros de la nanopartícula individual y al menos una parte de la superficie con poros de la nanopartícula individual están funcionalizadas. En una realización, al menos una parte de la superficie sin poros de la nanopartícula y al menos una parte de la superficie con poros tienen una funcionalización diferente. La superficie con poros también se denomina en el presente documento superficie interior. Las nanopartículas también

pueden tener una superficie sin poros (o superficie no porosa). La superficie sin poros también se denomina en el presente documento superficie exterior de nanopartículas.

[0043] La superficie con poros (por ejemplo, al menos una parte de la superficie con poros) y/o la superficie sin poros (por ejemplo, al menos una parte de la superficie sin poros) de la nanopartícula se pueden funcionalizar. Por ejemplo, las nanopartículas pueden hacerse reaccionar con compuestos de manera que un grupo funcional del compuesto se presente sobre (por ejemplo, se una de manera covalente a) la superficie de la nanopartícula. La superficie se puede funcionalizar con grupos hidrófilos (por ejemplo, grupos polares, tales como grupos cetona, ácido carboxílico, grupos carboxilato y grupos éster), que proporcionan una superficie que tiene carácter hidrófilo, o grupos hidrófobos (por ejemplo, grupos no polares, tales como grupos alquilo, arilo, y alquilarilo), que proporcionan una superficie que tiene carácter hidrófobo. Dicha funcionalización es conocida en la técnica. Por ejemplo, el dietoxidimetilsilano (DEDMS) se puede condensar en al menos una parte de la superficie del poro, de modo que la superficie del poro tenga un carácter hidrófobo, lo que permite un mayor rendimiento de carga de una carga útil citotóxica hidrófoba en relación con las nanopartículas que no están funcionalizadas de esa manera.

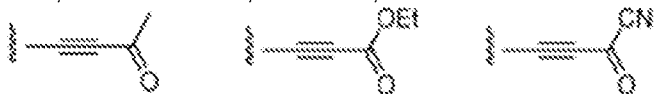
[0044] En aspectos preferidos de la presente divulgación, la superficie de la nanopartícula está al menos parcialmente funcionalizada con grupos polietilenglicol (PEG). La unión de PEG a la nanopartícula se puede lograr mediante un enlace covalente o un enlace no covalente, tal como mediante un enlace iónico, un enlace de hidrógeno, un enlace hidrófobo, coordinación, adhesivo y absorción física.

[0045] En ciertos aspectos, los grupos PEG están unidos (por ejemplo, unidos de manera covalente) a la superficie de la nanopartícula. En una nanopartícula de tipo núcleo-cubierta, los grupos PEG están unidos de manera covalente a la sílice en la superficie de la cubierta a través de un enlace Si-O-C o a la sílice en el núcleo. En una nanopartícula central, los grupos PEG están unidos de manera covalente a la sílice del núcleo.

[0046] En aspectos preferidos, la nanopartícula es una nanopartícula de tipo núcleo-cubierta, en la que los grupos PEG están unidos de manera covalente a la sílice en la superficie de la cubierta mediante un enlace Si-O-C. Los grupos PEG en la superficie de la nanopartícula pueden prevenir la adsorción de proteínas séricas a la nanopartícula en un entorno fisiológico (por ejemplo, en un sujeto), y pueden facilitar la excreción urinaria eficiente y disminuir la agregación de la nanopartícula (ver, por ejemplo, Burns et al. "Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine", Nano Letters (2009) 9(1):442-448).

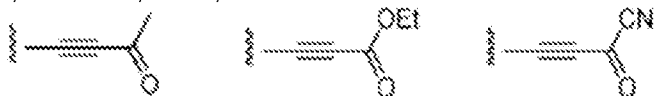
[0047] Los grupos PEG pueden derivarse de un polímero de PEG que tiene un peso molecular (Mw) de 400 g/mol a 2000 g/mol, incluidos todos los valores enteros de g/mol y los intervalos entre ellos. En una realización, los grupos PEG se derivan de un polímero de PEG que tiene un Mw de 460 g/mol a 590 g/mol, que contiene de 6 a 9 unidades de etilenglicol. En diversas realizaciones, las nanopartículas están funcionalizadas al menos en un 50 %, al menos en un 75 %, al menos en un 90 % o en al menos un 95 % con grupos PEG. En una realización, las nanopartículas se funcionalizan con grupos PEG con el número máximo de grupos PEG de modo que los poros permanezcan accesibles (por ejemplo, los poros se pueden funcionalizar). En una realización, la superficie de los poros es una superficie de sílice que tiene grupos silanol (Si-OH) terminales.

[0048] Una unidad de polietilenglicol descrita en el presente documento puede funcionalizarse con un grupo funcional, por ejemplo, un grupo de "química clic", tal como dibenzociclooctino (DBCO) o azida, un dieno (por ejemplo, ciclopentadieno), una maleimida, un éster de NHS, una amina, un tiol o un resto de acetileno activado tal como



Si bien se puede usar DBCO, el grupo funcional también puede ser otro alquino, tal como otro alquino tensionado (por ejemplo, DIBO o un derivado del mismo, o un derivado de DBCO). Además, el grupo funcional puede ser una nitrona o un óxido de nitrilo.

[0049] De manera alternativa, o además de lo anterior, se puede introducir un grupo funcional en un NDC sin requerir necesariamente un grupo PEG. Por ejemplo, un NDC puede funcionalizarse con un grupo funcional, tal como un grupo de "química clic", por ejemplo, dibenzociclooctino (DBCO) o azida; un dieno (por ejemplo, ciclopentadieno); una maleimida; un éster de NHS; una amina; un tiol; o un resto de acetileno activado tal como



que puede comprender cualquier enlazador adecuado, o puede no tener enlazador. Si bien se puede usar DBCO para funcionalizar la nanopartícula, el grupo funcional también puede ser otro alquino, tal como otro alquino tensionado (por ejemplo, DIBO o un derivado del mismo, o un derivado de DBCO). Además, el grupo funcional puede ser una nitrona o un óxido de nitrilo.

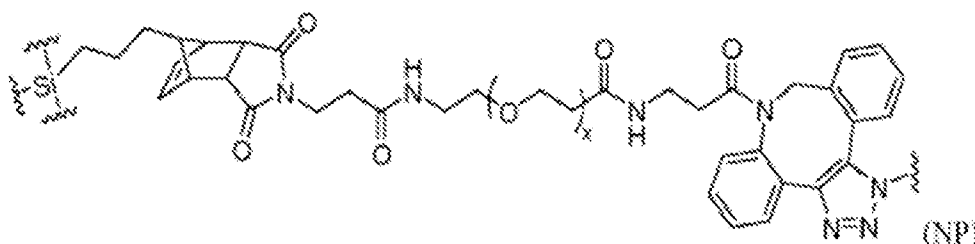
[0050] Por ejemplo, se puede introducir un enlazador funcionalizado con DBCO en una nanopartícula (por ejemplo, un C'Dot PEGilado) haciendo reaccionar el grupo silano en un compuesto de enlazador-DBCO-silano con un grupo silanol en la superficie de la nanopartícula (por ejemplo, debajo de la capa de PEG en la superficie C'Dot). De manera similar, se puede introducir un precursor funcionalizado con dieno (por ejemplo, precursor funcionalizado con ciclopentadieno) en una nanopartícula (por ejemplo, un C'Dot PEGilado) haciendo reaccionar el grupo silano en un compuesto precursor de enlazador-dieno-silano o dieno-silano con un grupo silanol en la superficie de la nanopartícula (por ejemplo, debajo de la capa de PEG en la superficie C'Dot), seguido de funcionalizar el dieno en la nanopartícula con un segundo precursor que comprende un grupo reactivo (por ejemplo, DBCO) a través de un dienófilo. El grupo enlazador en el enlazador-DBCO-silano o enlazador-dieno-silano puede comprender cualquier estructura (o subestructura), que incluye, pero sin limitación a los mismos, PEG, una cadena de carbonos (por ejemplo, alquilenos), un grupo heteroalquilenos o similares. El enlazador funcionalizado con dieno unido de manera covalente a la nanopartícula puede modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante reacción con un grupo funcionalizado con DBCO. Por ejemplo, el enlazador funcionalizado con dieno unido de manera covalente a la nanopartícula se puede poner en contacto con un compuesto enlazador-DBCO-maleimida (u otro enlazador-DBCO-dienófilo adecuado), para formar un cicloaducto entre el dieno y la maleimida, dando como resultado un NDC que comprende grupos DBCO unidos a su superficie, por ejemplo, usando química de cicloadición, tal como una cicloadición de Diels-Alder.

[0051] La funcionalización (por ejemplo, con uno de los grupos funcionales antes mencionados, tales como DBCO o ciclopentadieno) facilita la conjugación de ligandos dirigidos a FR funcionalizados adecuadamente y/o cargas útiles de fármacos funcionalizados (tales como ligandos dirigidos a FR funcionalizados con azida y/o cargas útiles de fármacos funcionalizados con azida) a la nanopartícula mediante una reacción de acoplamiento, por ejemplo, mediante química clic, reacciones de cicloadición (3+2), acoplamiento de amida o reacción de Diels-Alder. Este enfoque de funcionalización también mejora la versatilidad de la química de la formulación y la estabilidad de las construcciones de NDC dirigidas a FR.

[0052] Una ventaja de los NDC descritos en el presente documento es que se pueden preparar usando grupos enlazadores o espaciadores relativamente estables, o precursores de los mismos. Los grupos enlazadores o espaciadores, o sus precursores, pueden evitar la escisión prematura o no deseada, que puede tener lugar usando otros enlazadores o precursores. Por ejemplo, ciertos procedimientos de funcionalización de nanopartículas emplean precursores de amina-silano (para proporcionar nanopartículas funcionalizadas con amina) que se modifican en los grupos amina para conjugar otros restos con la nanopartícula. Sin embargo, los precursores de amina-silano pueden ser inestables y autocondensarse durante la reacción, provocando una agregación no deseada. Los agregados pueden resultar muy difíciles de separar de las nanopartículas funcionalizadas. Además, los grupos amina en la superficie de la nanopartícula pueden promover una reactividad no deseada, lo que puede conducir a una liberación prematura de la carga útil o una liberación no deseada del ligando dirigido.

[0053] Los NDC descritos en el presente documento se pueden producir usando precursores relativamente estables, y los NDC son estables y altamente puros. Por ejemplo, las nanopartículas de los presentes NDC se pueden preparar con un precursor de silano-dieno (tal como un precursor de silano-ciclopentadieno), para producir una nanopartícula funcionalizada con uno o más grupos dieno. Los grupos dieno pueden entonces hacerse reaccionar con un segundo precursor, tal como un precursor que contiene dienófilo (por ejemplo, un derivado de PEG-maleimida, por ejemplo, una DBCO-PEG-maleimida), provocando la formación de un cicloaducto estable. La nanopartícula funcionalizada resultante, que comprende el cicloaducto, puede opcionalmente hacerse reaccionar con uno o más precursores posteriores (tales como precursores de ligando dirigido y/o precursores de conjugados de carga útil-enlazador descritos en el presente documento), para funcionalizar adicionalmente la nanopartícula. Los precursores de dieno-silano y los cicloaductos que se producen no exhiben las cualidades no deseadas de otras nanopartículas funcionalizadas, por ejemplo, tienen una estabilidad en suero relativamente alta, se pueden producir con alto rendimiento y pureza (por ejemplo, libres de precursor agregado). Véanse, por ejemplo, las figuras 33A-33B. Además, como este enfoque de funcionalización de nanopartículas es altamente modular, se puede introducir en la nanopartícula cualquier relación deseada de carga útil, ligando dirigido o de otro tipo. En los Ejemplos se proporcionan ejemplos de preparación de nanopartículas usando estos procedimientos y sus beneficios.

[0054] Los NDC de la presente divulgación pueden comprender una estructura de Fórmula (NP):



en la que x es un número entero de 0 a 20, por ejemplo, 4; en la que el átomo de silicio es parte de la nanopartícula; y

en la que el ^xadyacente al resto de triazol indica un punto de unión a un ligando dirigido o conjugado de carga útil-enlazador, ya sea directa o indirectamente, por ejemplo, a través de un enlazador o grupo espaciador, por ejemplo, un resto de PEG. Por ejemplo, la unión puede ser a un enlazador o grupo espaciador, por ejemplo, el enlazador de un conjugado de enlazador-carga útil, o un enlazador o grupo espaciador de un ligando dirigido a receptor de folato, por ejemplo, un resto de PEG. Los NDC de la presente divulgación se pueden preparar a partir de nanopartículas funcionalizadas con dieno (por ejemplo, ciclopentadieno), por ejemplo, conjugando un resto de enlazador (por ejemplo, un enlazador que comprende un dienófilo, tal como maleimida) con el dieno con una reacción de cicloadición.

[0055] La superficie de la cubierta de sílice de las nanopartículas se puede modificar usando agentes reticulantes conocidos para introducir grupos funcionales superficiales. Entre los agentes reticulantes se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, divinilbenceno, dimetacrilato de etilenglicol, trimetacrilato de trimetilolpropano, N,N'-metilen-bis-acrilamida, éteres alquílicos, azúcares, péptidos, fragmentos de ADN u otros agentes funcionalmente equivalentes conocidos.

[0056] Para permitir que la nanopartícula sea detectable no sólo mediante la obtención de imágenes ópticas (tales como imágenes de fluorescencia), sino también otras técnicas de obtención de imágenes, tales como tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía computarizada (CT) y obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), la nanopartícula también puede conjugarse con un agente de contraste, como un radionucleido.

[0057] Las nanopartículas pueden incorporar cualquier compuesto fluorescente adecuado, tal como un compuesto orgánico fluorescente, un colorante, un pigmento o una combinación de los mismos. Estos compuestos fluorescentes se pueden incorporar a la matriz de sílice del núcleo de la nanopartícula. Se conoce una amplia variedad de colorantes/fluoróforos fluorescentes químicamente reactivos adecuados; véase, por ejemplo, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 6ª ed., RP Haugland, ed. (1996). En aspectos preferidos de la presente divulgación, el compuesto fluorescente está encapsulado de manera covalente dentro del núcleo de la nanopartícula.

[0058] En algunos aspectos, el compuesto fluorescente puede ser, pero sin limitarse a estos, un colorante fluorescente del infrarrojo cercano (NIRF) que se coloca dentro del núcleo de sílice de la nanopartícula, que puede proporcionar mayor brillo y rendimiento cuántico fluorescente en relación con el colorante fluorescente libre. Es bien sabido que las sondas emisoras en infrarrojo cercano presentan una atenuación tisular y una autofluorescencia disminuidas (Burns et al. Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine", Nano Letters (2009) 9(1):442-448).

[0059] Los compuestos fluorescentes que se pueden usar (por ejemplo, encapsulados por un NDC) en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a los mismos, Cy5, Cy5.5 (también conocido como Cy5++), Cy2, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), ficoeritrina, Cy7, fluoresceína (FAM), Cy3, Cy3.5 (también conocido como Cy3++), Texas Red (cloruro de ácido sulfurodamina 101), LIGHTCYCLER®-Red 640, LIGHTCYCLER®-Red 705, tetrametilrodamina (TMR), rodamina, derivado de rodamina (ROX), hexaclorofluoresceína (HEX), rodamina 6G (R6G), el derivado de rodamina JA133, colorantes fluorescentes Alexa (tales como ALEXA FLUOR® 488, ALEXA FLUOR® 546, ALEXA FLUOR® 633, ALEXA FLUOR® 555 y ALEXA FLUOR® 647), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), yoduro de propidio, aminometilcumarina (AMCA), Spectrum Green, Spectrum Orange, Spectrum Aqua, LISSAMINE™ y complejos de metales de transición fluorescentes, tales como el europio.

[0060] Los compuestos fluorescentes que se pueden usar también incluyen proteínas fluorescentes, tales como GFP (proteína fluorescente verde), GFP mejorada (EGFP), proteína fluorescente azul y derivados (BFP, EBFP, EBFP2, azurita, mKalama1), proteína fluorescente cian y derivados (CFP, ECFP, Cerulean, CyPet) y proteína fluorescente amarilla y derivados (YFP, Citrine, Venus, YPet) (documentos WO 2008/142571, WO 2009/056282, WO 1999/22026).

[0061] En aspectos preferidos de la presente divulgación, el compuesto fluorescente se selecciona del grupo que consiste en Cy5 y Cy5.5. En aspectos preferidos, el compuesto preferido es Cy5.

[0062] Una nanopartícula fluorescente se puede sintetizar mediante las etapas de: (1) conjugarse de manera covalente un compuesto fluorescente, tal como un colorante fluorescente reactivo (por ejemplo, Cy5), con un resto reactivo que incluye, pero sin limitación a los mismos, maleimida, yodoacetamida, tiosulfato, amina, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorofenilo (STP), éster de sulfosuccinimido, ésteres de sulfodichlorofenol, cloruro de sulfonilo, hidroxilo, isotiocianato, carboxilo, a un compuesto de organosilano, tal como un compuesto de organosilano coreactivo, para formar un precursor de sílice fluorescente, y hacer reaccionar el precursor de sílice fluorescente para formar un núcleo fluorescente; o (2) hacer reaccionar el precursor de sílice fluorescente con un compuesto formador de sílice, tal como tetraalcoxisilano, para formar un núcleo fluorescente. A continuación, el núcleo fluorescente puede hacerse reaccionar con un compuesto formador de sílice, tal como un tetraalcoxisilano, para formar una cubierta de sílice sobre el núcleo, para proporcionar la nanopartícula fluorescente.

[0063] Las nanopartículas fluorescentes a base de sílice son conocidas en la técnica y se describen en los documentos US 8298677B2, US 9625456 B2, US 10548997 B2, US 9999694 B2, US 10039847 B2 y US 10548998 B2.

- 5 [0064] En aspectos preferidos de la presente divulgación, los NDC comprenden una nanopartícula que comprende un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo y polietilenglicol (PEG) está unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula, y un compuesto fluorescente se encapsula de manera covalente dentro del núcleo de la nanopartícula.

10 **Ligando dirigido**

- [0065] Los NDC de la presente divulgación pueden comprender un ligando dirigido que se une a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador. Los NDC con ligandos dirigidos pueden mejorar la internalización de la carga útil/los fármacos en las células tumorales y/o administrar fármacos a las células tumorales debido al aumento de la permeabilidad, así como la capacidad de reconocimiento de los NDC. El ligando dirigido puede permitir que la nanopartícula se dirija a un tipo de célula específico mediante la unión específica entre el ligando y el componente celular. El ligando dirigido también puede facilitar la entrada de la nanopartícula en la célula o en el transporte de barrera, por ejemplo, para analizar el entorno intracelular.

- 20 [0066] Los ligandos dirigidos de la presente divulgación son capaces de unirse a receptores en células tumorales. Específicamente, los ligandos dirigidos pueden unirse al receptor de folato (FR), incluidas las cuatro isoformas humanas de FR, incluidas FR alfa (FR α , también conocido como FOLR1), FR beta (FR β , también conocido como FOLR2), FR gamma (FR γ , también conocido como FOLR3) y FR delta (FR δ , también conocido como FOLR4). La conjugación del ligando dirigido a FR con la superficie de la nanopartícula de la presente divulgación permite la terapia dirigida de células, tejidos y tumores cancerosos que sobreexpresan FR. Por ejemplo, los NDC de la presente divulgación que comprenden ligandos dirigidos que pueden unirse al receptor alfa de folato (FR α), tal como ácido fólico, pueden usarse para dirigirse al cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer peritoneal, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata y cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica). Los NDC de la presente divulgación que comprenden ligandos dirigidos que pueden unirse al receptor beta de folato (FR β) pueden usarse para dirigirse a la leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica), la leucemia mielógena crónica (CML) y los macrófagos asociados a tumores. Los macrófagos asociados a tumores pueden reconocerse como un medio para modificar el estado inmunológico del tumor. Sin desear limitarse a ninguna teoría, la afinidad de unión de los NDC dirigidos a FR a los receptores de folato se puede mejorar debido al efecto de multivalencia.

- 40 [0067] El receptor de folato puede expresarse altamente en células tumorales sólidas, incluidos cánceres de ovario, riñón, pulmón, cerebro, endometrio, colorrectal, páncreas, gástrico, próstata, mama y pulmón de células no pequeñas. FR se sobreexpresa en otros cánceres, incluido el cáncer de las trompas de Falopio, el cáncer de cuello uterino, el mesotelioma, el cáncer de útero, el cáncer de esófago, el cáncer de estómago, el cáncer de vejiga, el cáncer de hígado, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de tiroides, el cáncer de piel y el cáncer testicular. FR también se sobreexpresa en neoplasias hematológicas, tales como la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia mielógena crónica (CML).

[0068] En aspectos preferidos de la presente divulgación, los ligandos dirigidos se unen al receptor de folato alfa (FR α), al receptor de folato beta (FR β), o a ambos.

- 50 [0069] La presente divulgación proporciona ligandos dirigidos a FR que son capaces de unirse a tipos de células específicas que tienen niveles elevados de FR α , tales como, pero sin limitación, cáncer (por ejemplo, adenocarcinomas) de útero, ovario, mama, cuello uterino, riñón, colon, testículos (por ejemplo, coriocarcinoma testicular), cerebro (por ejemplo, tumores cerebrales ependimarios), mesotelioma pleural maligno y adenocarcinoma pituitario no funcionante. La presente divulgación también proporciona ligandos dirigidos a FR que son capaces de dirigirse a la leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica), la leucemia mielógena crónica (CML) y los macrófagos asociados a tumores. El ligando dirigido puede ser cualquier molécula adecuada que pueda unirse a un FR, tal como FR α , tal como una pequeña molécula orgánica (por ejemplo, folato o un análogo de folato), una parte de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento scFv, un fragmento Fv, un diacuerpo dsFv, un fragmento dAb, un fragmento Fd, un fragmento Fd' o una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada), un mimético de anticuerpo (por ejemplo, aptámero, un affibody, affilin, affimer, anticalin, avimer, Darpin y similares), un ácido nucleico, lípido y similares.

- 65 [0070] En aspectos de la presente divulgación, el ligando dirigido es ácido fólico, o un derivado de unión al receptor de folato del mismo. Se entenderá que "ácido fólico" puede abarcar cualquier derivado amida o éster del ácido fólico. Por ejemplo, el ácido fólico libre puede modificarse para conjugarse con la nanopartícula a través de un grupo

espaciador, tal como PEG o un derivado de PEG (por ejemplo, formando un enlace amida entre el ácido carboxílico terminal del ácido fólico y un átomo de nitrógeno del grupo espaciador).

[0071] Los NDC dirigidos a FR no solo pueden acumularse en una célula cancerosa o un tumor, sino que también pueden penetrar el tejido tumoral y administrar cargas útiles a todo el tejido tumoral para una eficacia óptima del tratamiento. Sin desear estar ligado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que los ligandos dirigidos se unen a los grupos de receptores específicos en la superficie de la célula cancerosa, lo que da como resultado la captación de NDC por parte de las células mediada por receptores. Esta captación de NDC por parte de las células mediada por receptores se produce a través del proceso de endocitosis y, finalmente, transporta los NDC a los endosomas y lisosomas de las células cancerosas.

[0072] En aspectos de la presente divulgación, los NDC comprenden un ligando dirigido que se une a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador. Por ejemplo, el ligando dirigido puede unirse a la nanopartícula directamente a través de la sílice de la nanopartícula (es decir, unido de manera covalente). En aspectos preferidos, el ligando dirigido se une a la nanopartícula indirectamente a través de un grupo espaciador adecuado.

[0073] El grupo espaciador puede ser cualquier grupo que pueda actuar como espaciador, por ejemplo, como espaciador entre un ligando dirigido y la nanopartícula, y unir el ligando dirigido a la nanopartícula. El grupo espaciador puede ser un enlazador divalente, tal como un enlazador divalente que comprende una longitud de cadena de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 átomos (por ejemplo, átomos de carbono, heteroátomos o una combinación de los mismos), tal como entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 átomos, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80 átomos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 átomos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 átomos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 átomos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 átomos, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 80 átomos, o entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 átomos. Los grupos espaciadores adecuados pueden comprender un alquileo, alquilenilo, alquilileno, heteroalquileo (por ejemplo, PEG), carbociclilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el grupo espaciador puede comprender un grupo PEG, un grupo alquileo o una combinación de los mismos. El grupo espaciador puede estar sustituido o no sustituido, por ejemplo, el grupo espaciador puede comprender un alquileo sustituido, un heteroalquileo sustituido o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el grupo espaciador puede comprender un grupo PEG (o espaciador de PEG), un grupo alquileo (o espaciador de alquileo), uno o más heteroátomos y/o uno o más grupos cíclicos (por ejemplo, grupos heterociclileno, tales como una piperazina).

[0074] El ligando dirigido, tal como ácido fólico, puede unirse a la nanopartícula indirectamente a través de un grupo espaciador de PEG. El ácido fólico puede estar presente en el NDC como una amida, por ejemplo, para facilitar la conjugación con un grupo espaciador de PEG u otro enlazador divalente, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1. El número de monómeros de PEG en un espaciador de PEG puede variar de 2 a 20, de 2 a 10, de 2 a 8 o de 2 a 5. En aspectos preferidos, el número de grupos de PEG como espaciadores en un ligando dirigido a FR funcionalizado es 3.

[0075] La relación promedio de nanopartícula con respecto a ligando dirigido (por ejemplo, ácido fólico) puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20. Por ejemplo, la relación promedio de nanopartícula con respecto al ligando dirigido (por ejemplo, ácido fólico) puede ser aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:40 o 1:50. Por ejemplo, la relación promedio de nanopartícula con respecto a ligando dirigido puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, por ejemplo, el número promedio de moléculas de ácido fólico en cada nanopartícula puede estar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20, por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, o aproximadamente 15 moléculas de ácido fólico por nanopartícula. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 10 moléculas de ácido fólico. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 11 moléculas de ácido fólico. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 12 moléculas de ácido fólico. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 13 moléculas de ácido fólico. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 14 moléculas de ácido fólico. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 15 moléculas de ácido fólico.

[0076] Un número menor de ligandos dirigidos unidos a la nanopartícula puede ayudar a mantener el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula, por ejemplo, para cumplir el intervalo de tamaño de corte de depuración renal (Hilderbrand et al., Near-infrared fluorescence: Application to in vivo molecular imaging, Curr. Opin. Chem. Biol., (2010) 14:71-79). El número de ligandos dirigidos medidos puede ser un número promedio de ligandos dirigidos unidos a más de una nanopartícula. De manera alternativa, se puede medir una nanopartícula para determinar el número de ligandos dirigidos unidos.

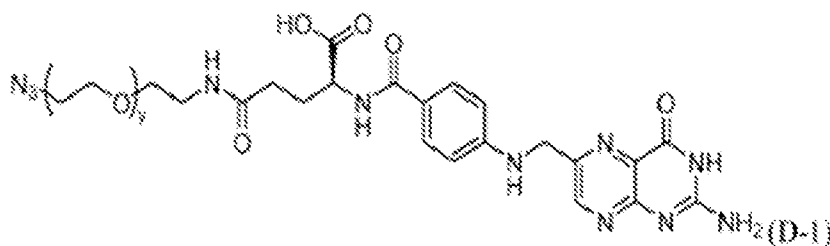
[0077] El número de ligandos dirigidos unidos a la nanopartícula se puede medir mediante cualquier procedimiento adecuado, tales como, pero sin limitación a los mismos, formación de imágenes ópticas, espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), UV-Vis, cromatografía, espectroscopia de masas o análisis enzimático indirecto.

[0078] El ligando dirigido se puede unir a la nanopartícula mediante un enlace covalente a la sílice de la nanopartícula (por ejemplo, indirectamente a través de un grupo espaciador). El ligando se puede conjugar con una nanopartícula (por ejemplo, a través de un grupo funcional en la superficie de la nanopartícula) descrita en el presente documento, por ejemplo, usando reacciones de acoplamiento, química Click (por ejemplo, una reacción de química Click 3+2), cicloadición (por ejemplo, una reacción de cicloadición 3+2 o 2+4, utilizando los grupos funcionales apropiados), o conjugación mediante un carboxilato, éster, alcohol, carbamida, aldehído, amina, óxido de azufre, óxido de nitrilo, nitrona, óxido de nitrógeno, haluro o cualquier otro compuesto adecuado conocido en la técnica.

[0079] En aspectos preferidos de la presente divulgación, la conjugación de ligandos dirigidos a FR se puede lograr mediante una reacción de "química clic" usando un grupo diarilciclooctino (DBCO). Cualquier mecanismo de reacción adecuado puede adaptarse en la presente divulgación para la "química clic", siempre que se pueda lograr una unión fácil y controlada del ligando dirigido a la nanopartícula.

[0080] En algunos aspectos, se introduce un triple enlace (por ejemplo, alquino, por ejemplo, alquino terminal) sobre la superficie de una nanopartícula (por ejemplo, a través de un PEG conjugado de manera covalente con la cubierta de la nanopartícula, o a través de otro grupo enlazador o espaciador adecuado). Por separado, se puede introducir un enlace azida u otro grupo que sea reactivo con un triple enlace en el ligando dirigido deseado. Por ejemplo, el ácido fólico puede modificarse conjugando el ácido carboxílico terminal del ácido fólico con un grupo espaciador (por ejemplo, un resto PEG), que comprende una azida en un extremo). La nanopartícula (por ejemplo, nanopartícula PEGilada) que comprende el triple enlace libre, y el ligando dirigido (que comprende un grupo reactivo con el triple enlace), se pueden mezclar (con o sin un catalizador de cobre u otro metal) para efectuar la cicloadición del grupo reactivo con el triple enlace (por ejemplo, azida) al triple enlace, lo que da como resultado la conjugación del ligando dirigido con la nanopartícula (por ejemplo, "química clic"). También se pueden utilizar muchas variaciones de este enfoque, tal como resultará fácilmente evidente para una persona con conocimientos habituales en la técnica.

[0081] Un ligando a FR funcionalizado con azida (donde el ligando a FR puede comprender un grupo espaciador, y el grupo espaciador puede poseer el grupo azida) se puede unir a la nanopartícula ya sea directa o indirectamente a través de un alquino (por ejemplo, grupo DBCO). Grupos espaciadores, tales como, pero sin limitación, grupos PEG, pueden estar presentes en un precursor de ligando dirigido a FR y pueden poseer un grupo terminal (por ejemplo, azida) para facilitar la conjugación con la nanopartícula, y después de la conjugación, el grupo espaciador puede estar dispuesto entre el ligando dirigido y la nanopartícula. Por ejemplo, el precursor del ligando dirigido a FR puede comprender una estructura de Fórmula (D-1):



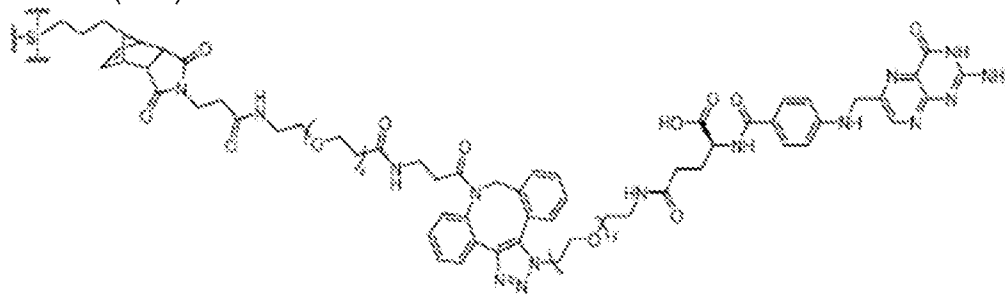
en la que y es un número entero de 0 a 20 (por ejemplo, 3). Por ejemplo, y puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, por ejemplo, 2, 3 o 4.

[0082] En algunos aspectos, el ligando dirigido a FR puede funcionalizarse con un grupo terminal adecuado, tal como, pero sin limitación, un grupo azida. El ligando a FR funcionalizado con azida se puede unir a la nanopartícula directa o indirectamente a través de los grupos DBCO. Pueden estar presentes grupos espaciadores, tales como, pero sin limitación a los mismos, grupos PEG, entre el ligando a FR funcionalizado con azida y la nanopartícula. En aspectos preferidos, el ligando dirigido a FR está funcionalizado para incluir grupos espaciadores, tales como, pero sin limitación a los mismos, grupos PEG que terminan con un grupo azida que reacciona con los grupos DBCO en la superficie de la nanopartícula.

[0083] La funcionalización del ligando dirigido a FR puede incluir grupos PEG hidrófilos como espaciadores, que pueden mejorar la solubilidad en agua y pueden reducir o eliminar la agregación y precipitación de la nanopartícula.

[0084] En aspectos de la presente divulgación, el número de grupos PEG como espaciadores que pueden estar presentes en un ligando dirigido a FR funcionalizado puede estar en el intervalo de 2 a 20, de 2 a 10, de 2 a 8, o de 2 a 5. En aspectos preferidos, el número de grupos PEG como espaciadores en un ligando dirigido a FR funcionalizado es 3.

[0085] Los NDC de la presente divulgación que comprenden un ligando dirigido pueden comprender una estructura de Fórmula (NP-2):



en la que x es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, por ejemplo, 4), e y es un número entero de 0 a 20 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, por ejemplo, 3), y el átomo de silicio es parte de la nanopartícula (por ejemplo, unido con la cubierta de sílice de una nanopartícula de sílice de núcleo-cubierta). Por ejemplo, x puede ser 4 e y puede ser 3. Cada nanopartícula de los NDC divulgados en el presente documento puede comprender más de una molécula de Fórmula (NP-2), por ejemplo, la nanopartícula puede comprender entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 moléculas de Fórmula (NP-2), por ejemplo, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 moléculas de Fórmula (NP-2), entre aproximadamente 8 y aproximadamente 15 moléculas de Fórmula (NP-2), entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15 moléculas de Fórmula (NP-2), por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 moléculas de Fórmula (NP-2). Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 12 moléculas de Fórmula (NP-2). Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 13 moléculas de Fórmula (NP-2).

Conjugado enlazador-carga útil

[0086] Los NDC de la presente divulgación también pueden comprender un conjugado de enlazador-carga útil que se une a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador. En aspectos preferidos, el conjugado de enlazador-carga útil se une a la nanopartícula a través de un grupo espaciador. La carga útil puede ser exatecán, o una sal o análogo del mismo.

[0087] El grupo espaciador puede ser cualquier grupo que pueda actuar como espaciador, por ejemplo, como espaciador entre un conjugado de carga útil/enlazador y la nanopartícula, y unir el conjugado de enlazador-carga útil a la nanopartícula. El grupo espaciador puede ser un enlazador divalente, tal como un enlazador divalente que comprende una longitud de cadena de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 átomos (por ejemplo, átomos de carbono, heteroátomos o una combinación de los mismos), tal como entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 átomos, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80 átomos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 átomos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 átomos, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 átomos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 átomos, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 80 átomos, o entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 átomos. Los grupos espaciadores adecuados pueden comprender un alquileo, alquilenilo, alquinileno, heteroalquileo (por ejemplo, PEG), carbociclilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el grupo espaciador puede comprender un grupo PEG, un grupo alquileo o una combinación de los mismos. El grupo espaciador puede estar sustituido o no sustituido, por ejemplo, el grupo espaciador puede comprender un alquileo sustituido, un heteroalquileo sustituido o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el grupo espaciador puede comprender un grupo PEG (o espaciador de PEG), un grupo alquileo (o espaciador de alquileo), uno o más heteroátomos y/o uno o más grupos cíclicos.

[0088] Se entenderá que se pueden realizar modificaciones químicas a la carga útil para hacer que las reacciones de la carga útil con el enlazador sean más convenientes para los fines de preparar conjugados de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede añadir un grupo funcional, por ejemplo, amina, hidroxilo o sulfhidrilo, a la carga útil (por ejemplo, exatecán) en una posición que tiene un efecto mínimo o aceptable sobre la actividad u otras propiedades de la carga útil (por ejemplo, exatecán). De manera alternativa, un grupo funcional existente en la carga útil (por ejemplo, un grupo amina colgante) puede ser el punto de unión al enlazador. Por ejemplo, el exatecán contiene un grupo funcional amina adecuado para acoplarse al resto de enlazador.

[0089] La carga útil (por ejemplo, carga útil de exatecán, o una sal o análogo del mismo) se puede escindir de la nanopartícula dentro de una célula, o de un orgánulo celular, por ejemplo, mediante una enzima, liberando así exatecán, por ejemplo, dentro de la célula u orgánulo celular. El exatecán es un inhibidor de la topoisomerasa 1 (Topo-1) que puede estabilizar los complejos de ADN y la enzima Topo-1, evitando la relegación del ADN e induciendo

roturas letales en las cadenas de ADN. La generación de estas lesiones de ADN es eficaz para matar células cancerosas, lo que permite que los NDC de la presente divulgación alcancen el efecto terapéutico deseado.

[0090] En aspectos preferidos de la presente divulgación, la carga útil es exatecán o una sal del mismo. En otros aspectos preferidos de la presente divulgación, la carga útil es un análogo de exatecán o una sal del mismo.

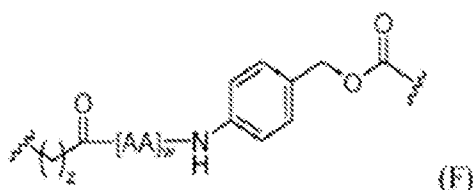
[0091] En aspectos de la presente divulgación, la relación promedio de nanopartículas con respecto a carga útil varía de 1 a 80, de 1 a 70, de 1 a 60, de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 15, de 1 a 12 y preferiblemente de 1 a 10. Por ejemplo, la relación promedio de nanopartícula con respecto a carga útil (por ejemplo, exatecán o una sal o análogo del mismo) puede ser aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:32, 1:34, 1:36, 1:38, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75 o 1:80. Por ejemplo, el número promedio de moléculas de exatecán en cada nanopartícula puede estar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25, o entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30. por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29 o aproximadamente 30 moléculas de exatecán por nanopartícula. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 18 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 19 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 20 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 21 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 22 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 23 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 24 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 25 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 26 moléculas de exatecán. Un NDC descrito en el presente documento puede comprender aproximadamente 27 moléculas de exatecán.

[0092] La vintafolida, desarrollada por Endocito y Merck & Co., es un conjugado de fármaco de molécula pequeña que consiste en una molécula pequeña dirigida al receptor de folato, que se sobreexpresa en ciertos cánceres, tales como el cáncer de ovario, y un fármaco de quimioterapia, vinblastina (documentos US 7601332 B2 y US 1002942 B2). Sin embargo, la vintafolida es capaz de transportar una sola molécula de carga útil, unida al resto dirigido mediante un enlazador escindible por pH. A diferencia de esto, en la presente divulgación se pueden incorporar varias cargas citotóxicas (por ejemplo, moléculas de exatecán) en la superficie de una sola nanopartícula.

[0093] Los enlazadores en los conjugados de enlazador-carga útil pueden ser enlazadores autoinmolables que son capaces de liberar la carga útil activa *in vitro* así como *in vivo* en condiciones suficientes para la liberación enzimática de la carga útil activa (por ejemplo, una condición que presenta una enzima capaz de catalizar la liberación).

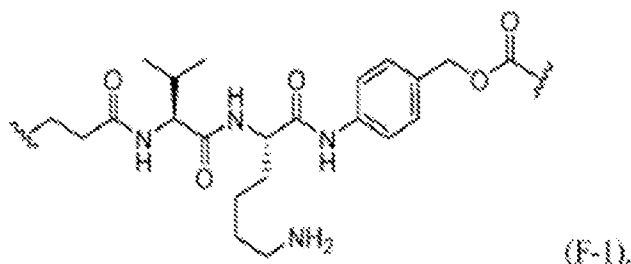
[0094] Los enlazadores descritos en el presente documento se pueden usar, por ejemplo, para unir una carga útil de fármaco citotóxico (por ejemplo, exatecán) a un portador y/o un resto dirigido (por ejemplo, nanopartícula) que se une a una célula cancerosa (por ejemplo, se une a un receptor en la superficie de una célula cancerosa) y se internaliza en la célula (por ejemplo, a través del endosoma y el compartimento lisosomal). Una vez internalizados, los enlazadores pueden escindirse o degradarse para liberar un fármaco citotóxico activo. Específicamente, los enlazadores escindibles por proteasas pueden liberar su carga útil bajo la acción de proteasas, tales como cathepsina, tripsina u otras proteasas, en el compartimento lisosomal de la célula.

[0095] Los enlazadores escindibles descritos en el presente documento pueden comprender una estructura de Fórmula (F):



en la que cada caso de [AA] es un residuo de aminoácido natural o no natural; z es un número entero de 1 a 5; w es un número entero de 1 a 4 (por ejemplo, 2 o 3); y cada uno  indica un punto de unión, por ejemplo, a un grupo espaciador (por ejemplo, PEG) u otra parte del enlazador, o a una molécula de exatecán. Por ejemplo, $-[AA]_w-$ puede comprender Val-Lys, Val-Cit, Phe-Lys, Trp-Lys, Asp-Lys, Val-Arg o Val-Ala, y z puede ser 2, donde uno indica  una unión al átomo de oxígeno de un grupo PEG, y el otro  indica una unión al átomo de nitrógeno de exatecán. Por ejemplo, $-[AA]_w-$ puede comprender Val-Lys.

[0096] Los enlazadores escindibles descritos en el presente documento pueden comprender una estructura de Fórmula (F-1):



en la que uno  indica un punto de unión al átomo de oxígeno de un grupo PEG y el otro  indica un punto de unión al átomo de nitrógeno de exatecán.

[0097] Los enlazadores de esta divulgación se pueden preparar a partir de precursores de enlazadores que contienen grupos reactivos en uno o ambos extremos de la molécula. Los grupos reactivos se pueden seleccionar para permitir la conjugación con exatecán o un análogo del mismo en un extremo, y también facilitar la conjugación con la nanopartícula en el otro extremo. Es deseable que la carga útil contenga una amina, un hidroxilo, una hidrazona, una hidrazida o un grupo sulfhidrilo para facilitar la conjugación con el enlazador. Por ejemplo, el exatecán comprende un grupo amino primario que puede facilitar su conjugación con el enlazador.

[0098] Los precursores del conjugado de enlazador-carga útil se pueden unir a la nanopartícula usando cualquier técnica y procedimiento adecuados, y muchas de dichas técnicas son bien conocidas en el sector. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2017/189961, WO 2015/183882, WO 2013/192609, WO 2016/179260 y WO 2018/213851, que describen nanopartículas de núcleo-cubierta a base de sílice o núcleo a base de sílice que se pueden usar para preparar sistemas de administración de fármacos basados en nanopartículas dirigidas. Además, los precursores del conjugado de enlazador-carga útil, o precursores del ligando-enlazador, se pueden unir a una nanopartícula usando una reacción o procedimiento descrito en Kolb et al. Angew. Chem. Int. Ed. (2001) 40:2004-2021.

[0099] El conjugado de enlazador-carga útil se puede unir a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador, tal como un grupo espaciador descrito en el presente documento. Los grupos espaciadores adecuados incluyen, pero sin limitarse a los mismos, un enlazador divalente (por ejemplo, un enlazador divalente descrito en el presente documento), tal como un espaciador de PEG, o un espaciador de alquileo (por ejemplo, un espaciador de metileno), que puede comprender además un heteroátomo o un grupo cíclico (por ejemplo, un grupo heterociclileno). El conjugado de enlazador-carga útil puede absorberse en los intersticios o poros de la cubierta de sílice, o recubrirse sobre la cubierta de sílice de la nanopartícula, tal como una nanopartícula fluorescente (por ejemplo, unida de manera covalente a la superficie de la nanopartícula). En otros aspectos, cuando la cubierta de sílice no cubre toda la superficie de la nanopartícula, el conjugado de enlazador-carga útil puede asociarse con el núcleo fluorescente, tal como mediante absorción física o mediante interacción de enlace.

[0100] En algunos aspectos, el conjugado de enlazador-carga útil también puede estar asociado con los grupos PEG que están unidos de manera covalente a la superficie de la nanopartícula. Por ejemplo, el conjugado de enlazador-carga útil puede unirse a la nanopartícula a través del PEG. Los PEG pueden tener múltiples grupos funcionales para unirse a la nanopartícula y al conjugado de enlazador-carga útil.

[0101] En aspectos específicos de la presente divulgación, los conjugados de enlazador-carga útil (o precursor del conjugado de enlazador-carga útil) pueden funcionalizarse con un espaciador de PEG hidrófilo. El precursor del conjugado de enlazador-carga útil puede funcionalizarse con un espaciador de PEG hidrófilo y/o un grupo terminal adecuado, tal como, pero sin limitación a los mismos, un grupo azida, para facilitar la unión covalente del conjugado

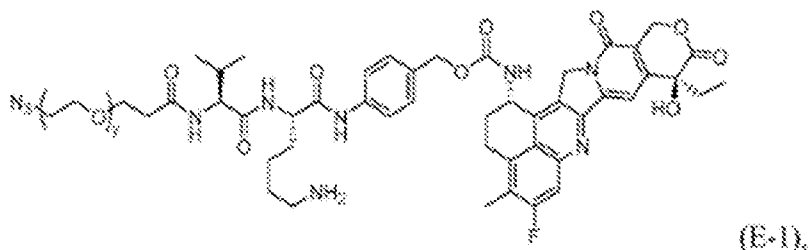
de enlazador-carga útil (por ejemplo, a través del grupo espaciador) a la superficie de la nanopartícula, por ejemplo, mediante reacción con un grupo DBCO en la superficie de la nanopartícula). Otros grupos terminales pueden incluir un óxido de nitrilo o nitrona, por ejemplo, para la conjugación mediante una reacción de cicloadición 3+2, a un grupo adecuado en la nanopartícula (por ejemplo, un resto de dieno).

[0102] El número de grupos PEG como espaciadores que pueden estar presentes en un conjugado de enlazador-carga útil funcionalizado (o precursor del mismo) puede variar de 0 a 20, por ejemplo, de 2 a 20, de 2 a 10 o de 5 a 8, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. En aspectos preferidos, el número de grupos PEG como espaciadores en un conjugado de enlazador-carga útil funcionalizado es 9.

[0103] Por ejemplo, el exatecán se puede conjugar con un enlazador escindible por proteasa para formar el conjugado de enlazador-carga útil. Este enlazador-conjugado se puede preparar a partir de un precursor funcionalizado con un espaciador de PEG que tiene un grupo reactivo terminal, tal como una azida, para una conjugación adicional con la superficie de la nanopartícula, por ejemplo, a través de un grupo DBCO.

[0104] El enlazador escindible por proteasa puede diseñarse para que sea lábil frente a cathepsina B (Cat-B), una enzima que se sobreexpresa en tumores malignos, efectuando de ese modo la liberación del agente citotóxico, tal como exatecán, mediante un proceso autoinmolante.

[0105] El precursor del conjugado de enlazador-carga útil puede comprender una estructura de Fórmula (E-1):

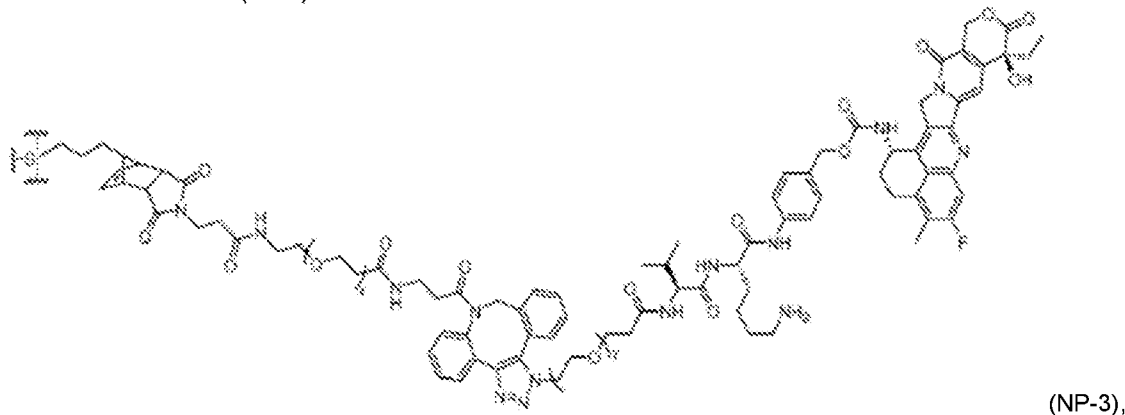


en la que y es un número entero de 0 a 20, por ejemplo, de 5 a 15, por ejemplo, 9.

[0106] El enlazador y los conjugados de enlazador-carga útil descritos en la presente divulgación tienen varias ventajas, que van desde una estabilidad sérica superior hasta un mecanismo cinético de liberación más rápido, en relación con las plataformas de administración de fármacos, enlazadores o conjugados de enlazador-carga útil convencionales. Además, la capacidad de emparejar estos enlazadores con una variedad de grupos químicos brinda la oportunidad de la liberación selectiva de carga útil/fármacos libres, con una derivatización mínima, lo que constituye una ventaja significativa.

[0107] En aspectos preferidos de la presente divulgación, el enlazador en el conjugado enlazador-carga útil es un enlazador escindible por proteasa.

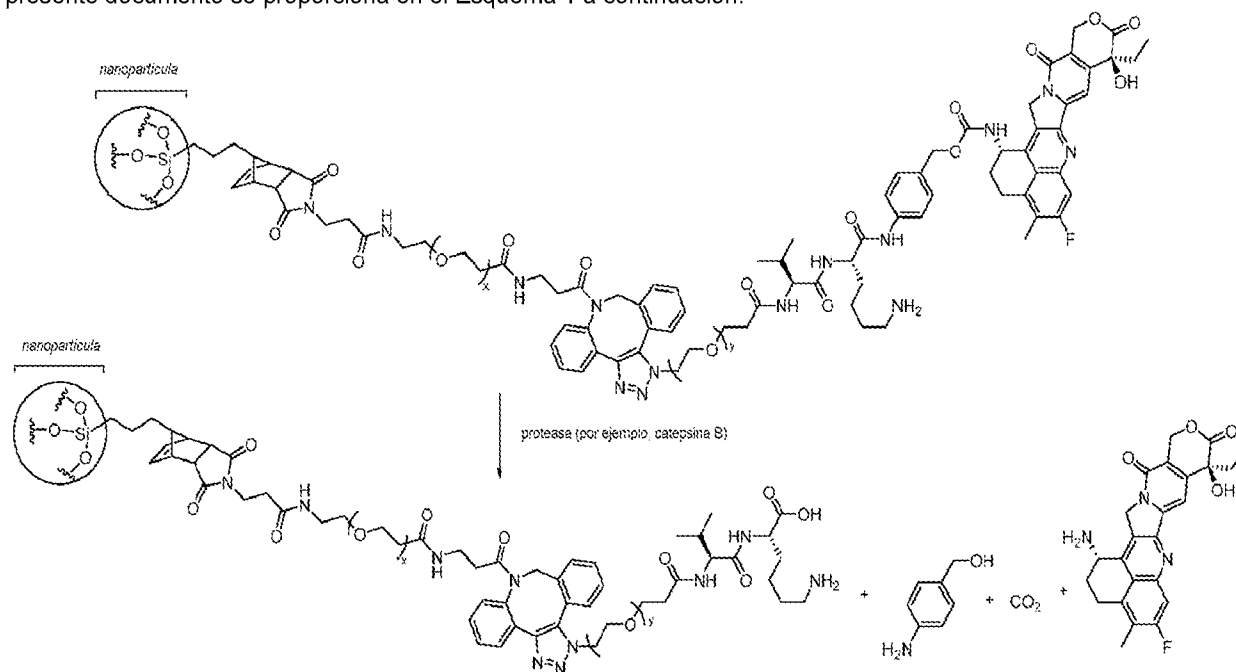
[0108] Los NDC de la presente divulgación que comprenden un resto carga útil-enlazador pueden comprender una estructura de Fórmula (NP-3):



en la que x es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, por ejemplo, 4), e y es un número entero de 0 a 20 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, por ejemplo, 9), y el átomo de silicio es parte de la nanopartícula (por ejemplo, unido con la cubierta de sílice de una nanopartícula núcleo-cubierta de sílice. Por ejemplo, x puede ser 4 e y puede ser 9. Un NDC divulgado en el presente documento

puede comprender más de una molécula de Fórmula (NP-3), por ejemplo, la nanopartícula puede comprender entre aproximadamente 1 y aproximadamente 80 moléculas de Fórmula (NP-3), por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 60 moléculas de Fórmula (NP-3), entre aproximadamente 1 y aproximadamente 40 moléculas de Fórmula (NP-3), entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 moléculas de Fórmula (NP-3), entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 moléculas de Fórmula (NP-3), entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 moléculas de Fórmula (NP-3), por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29 o aproximadamente 30 moléculas de Fórmula (NP-3).

[0109] Tras el contacto con una proteasa (por ejemplo, dentro de una célula cancerosa, tal como dentro del lisosoma de una célula cancerosa), un NDC de la presente divulgación puede experimentar escisión para liberar exatecán libre. La escisión de un NDC descrito en el presente documento puede liberar concomitantemente exatecán, dióxido de carbono y alcohol 4-aminobencílico del NDC. Por ejemplo, la escisión de un NDC de ejemplo divulgado en el presente documento se proporciona en el Esquema 1 a continuación.



Esquema 1. Mecanismo de escisión de ejemplo de un NDC descrito en el presente documento

[0110] Los NDC descritos en el presente documento pueden comprender tanto una molécula de Fórmula (NP-2) como una molécula de Fórmula (NP-3), por ejemplo, cada NDC puede comprender aproximadamente 1 y aproximadamente 20 moléculas de Fórmula (NP-2), y aproximadamente 1 y aproximadamente 30 moléculas de Fórmula (NP-3). Por ejemplo, cada NDC puede comprender aproximadamente 10 y aproximadamente 15 moléculas de Fórmula (NP-2), y aproximadamente 15 y aproximadamente 25 moléculas de Fórmula (NP-3). Un NDC divulgado en el presente documento puede comprender un promedio de 13 moléculas de Fórmula (NP-2) y un promedio de 21 moléculas de Fórmula (NP-3); un promedio de 12 moléculas de Fórmula (NP-2), y un promedio de 25 moléculas de Fórmula (NP-3); un promedio de 12 moléculas de Fórmula (NP-2), y un promedio de 20 moléculas de Fórmula (NP-3).

[0111] La presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos dirigidos a un conjugado de nanopartícula-fármaco (NDC) que comprende: una nanopartícula; un ligando dirigido que se une al receptor de folato; y un conjugado de enlazador-carga útil, en el que el NDC tiene un diámetro promedio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm. Por ejemplo, una nanopartícula que comprende ácido fólico como ligando dirigido y un conjugado de enlazador-carga útil que comprende exatecán conjugado mediante un enlazador escindible por proteasa, en el que el NDC tiene un diámetro promedio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm.

[0112] La figura 1 ilustra un conjugado nanopartícula-fármaco (NDC) representativo que tiene un diámetro promedio de aproximadamente 6 nm, que comprende una nanopartícula que comprende un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo, polietilenglicol (PEG) unido de forma covalente a la superficie de la nanopartícula, y un compuesto fluorescente (Cy5) encapsulado de manera covalente dentro del núcleo

de la nanopartícula, ácido fólico (FA) como ligando dirigido que puede unirse a un receptor de folato, y un conjugado de enlazador-carga útil que comprende un conjugado de exatecán-enlazador escindible por proteasa. Se entenderá que "ácido fólico" pretende abarcar cualquier derivado de amida o éster del ácido fólico, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1 donde el ácido fólico está unido de manera covalente al grupo espaciador (PEG) a través de un grupo amida.

[0113] El NDC puede tener un diámetro promedio entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 8 nm, o entre aproximadamente 6 nm y aproximadamente 7 nm. El diámetro promedio de los NDC se puede medir mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como, pero sin limitación, espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) (ver, por ejemplo, Figura 6) y cromatografía de permeación en gel (GPC) (Figura 7).

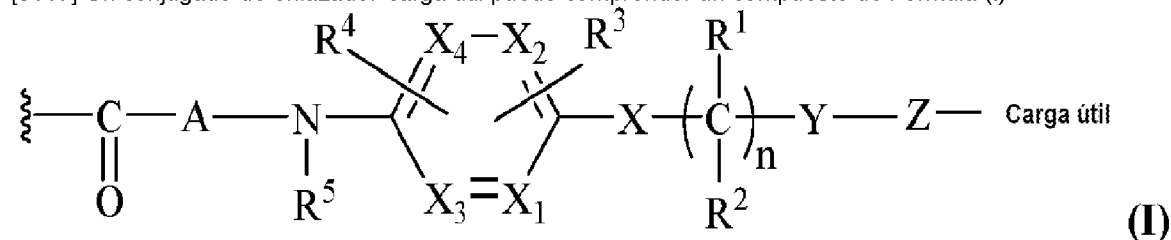
[0114] Los NDC de la presente divulgación pueden comprender nanopartículas que pueden funcionalizarse con agentes de contraste para tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), tomografía computarizada (CT), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) y obtención de imágenes ópticas (tales como obtención de imágenes de fluorescencia que incluyen obtención de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIRF), obtención de imágenes de bioluminiscencia o combinaciones de los mismos).

[0115] Se puede unir a la nanopartícula un agente de contraste, tal como un radionucleido (radiomarcador) que incluye, pero sin limitación a los mismos, ^{89}Zr , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I y ^{177}Lu . De manera alternativa, la nanopartícula se puede unir a un resto quelante, por ejemplo, DFO, DOTA, TETA y DTPA, que está adaptado para unirse a un radionucleido. Dicha nanopartícula puede detectarse mediante PET, SPECT, CT, MRI o imágenes ópticas (tales como obtención de imágenes de fluorescencia que incluyen obtención de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIRF), obtención de imágenes de bioluminiscencia o combinaciones de las mismas).

[0116] El radionucleido puede servir adicionalmente como agente terapéutico para crear una plataforma multitrapéutica. Este acoplamiento permite que el agente terapéutico se administre al tipo de célula específico a través de la unión específica entre el ligando dirigido y el componente celular.

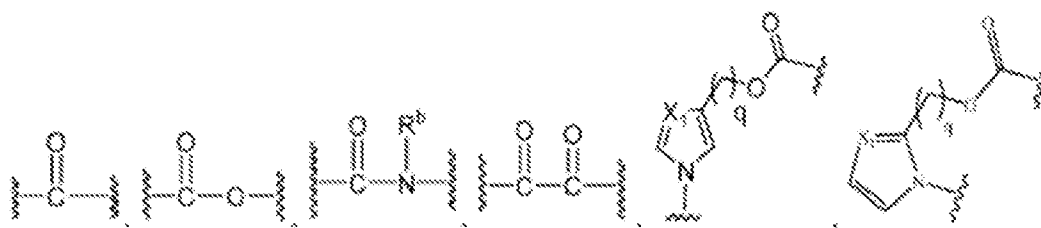
Conjugados de carga útil-enlazador escindible por proteasa

[0117] Un conjugado de enlazador-carga útil puede comprender un compuesto de Fórmula (I)



o una sal del mismo, en la que,

[0118] la línea ^{xxx} representa una unión a la nanopartícula a través de un grupo espaciador; A es un dipéptido seleccionado del grupo que consiste en Val-Cit, Phe-Lys, Trp-Lys, Asp-Lys, Val-Lys, Val-Arg y Val-Ala, o A es un tetrapéptido seleccionado del grupo que consiste en Val-Phe-Gly-Sar, Val-Cit-Gly-Sar, Val-Lys-Gly-Sar, Val-Ala-Gly-Sar, Val-Phe-Gly-Pro, Val-Cit-Gly-Pro, Val-Lys-Gly-Pro, Val-Ala-Gly-Pro, Val-Cit-Gly-cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Val-Lys-Gly-cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Val-Phe-Gly-cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Val-Ala-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Phe-Lys-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, y Trp-Lys-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural; la carga útil es exatecán, y y el grupo de amina primaria de exatecán está representado por Z; R¹ y R² en cada caso son de manera independiente hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o alcoxi C₁₋₆ sustituido o no sustituido, o hidroxilo; R³ y R⁴ en cada caso son de manera independiente hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o alcoxi C₁₋₆ sustituido o no sustituido; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido; cicloalquilo C₃₋₇ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo C₅₋₆ sustituido o no sustituido, con la condición de que, cuando A es un dipéptido, R⁵ es H; R^a, R^b y R^c en cada caso son de manera independiente hidrógeno, oalquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido; X está ausente, -O-, -CO- o -NR^a-; Y está ausente.

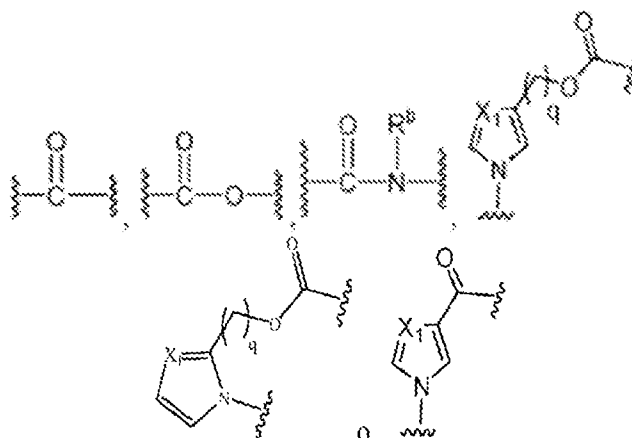


0



5

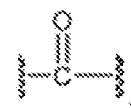
en el que el carbonilo en



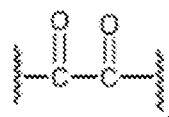
10

está unido a Zi, con la condición de que, cuando Y es

15

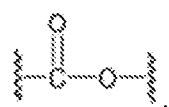


X está ausente y n es 1; cuando Y es



20

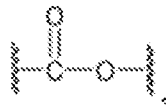
X está ausente y n es 0; cuando Y es



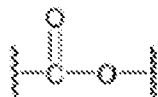
25

X está ausente y n es 0; y/o cuando X es -CO-, Y está ausente y n es 0; X₁ y X₂ son de manera independiente -CH- o -N-; X₃ es -CH-; X₄ es -CH-; Z es -NR^c- o -O-; n es 0 o 1; q es de 1 a 3.

[0119] En aspectos preferidos de la Fórmula (I), A es Val-Lys; R¹-R⁵ son cada uno de manera independiente hidrógeno; X está ausente; Y es



5 en el que el carbonilo en

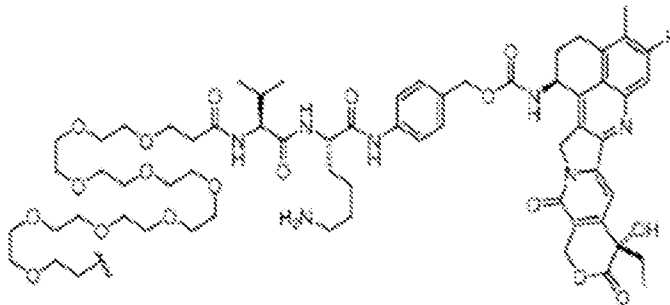


10 está unido a Z; n es 1; X₁, X₂, X₃ y X₄ son cada uno de manera independiente -CH-; Z es -NR^c- en el que R^c es hidrógeno y en el que N es el átomo de nitrógeno presente en la carga útil de exatecán.

[0120] En el conjugado de enlazador-carga útil de Fórmula (I), la carga útil puede ser exatecán, que tiene un grupo funcional que está unido al enlazador, en el que el grupo funcional es una amina (cuando el exatecán está unido al enlazador, es una amina secundaria, y una vez liberada (o antes de la conjugación), es decir, como una entidad molecular separada, la amina del exatecán es una amina primaria).

[0121] *Ejemplos de conjugados enlazador-carga útil:* los conjugados de enlazador-carga útil representativos de la presente divulgación incluyen, pero sin limitarse a los mismos, las siguientes subestructuras, en las que la línea  representa un enlace directo a la nanopartícula o un enlace indirecto a la nanopartícula a través de un grupo espaciador. Entre los grupos espaciadores adecuados se incluyen, pero sin limitación a los mismos, un espaciador de PEG o un espaciador de alquileo (por ejemplo, espaciador de metileno), que puede comprender además heteroátomos o grupos cíclicos (por ejemplo, grupos heterocíclicos). En aspectos preferidos, el grupo espaciador es un espaciador de PEG.

25 [0122] Un conjugado de enlazador-carga útil de ejemplo de Fórmula (I) de la presente divulgación incluye la siguiente subestructura:

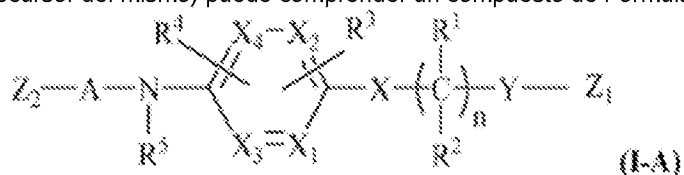


[0123] Enlazadores y precursores de los mismos: Los enlazadores de esta divulgación, y/o sus precursores, pueden contener grupos reactivos en ambos extremos de la molécula. Los grupos reactivos se pueden seleccionar para permitir la conjugación con exatecán o una sal o análogo del mismo en un extremo, y también facilitar la conjugación con una nanopartícula (por ejemplo, a través de un grupo espaciador) en el otro extremo. Por ejemplo, el enlazador puede conectarse al exatecán a través de un grupo funcional químicamente reactivo que forma parte del exatecán, tal como la amina primaria del exatecán (que se convierte en una amina secundaria tras la conjugación con el enlazador).

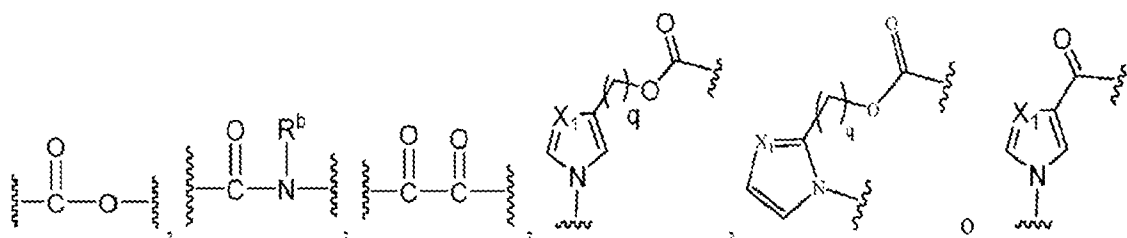
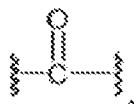
35 [0124] El enlazador se puede conjugar con un polietilenglicol funcionalizado o una cadena de alquilo C₅-C₆ a través de un grupo funcional químicamente reactivo que es parte del enlazador, tal como una amina primaria o secundaria o un grupo carboxilo.

40 [0125] Enlazadores escindibles por proteasa: Las proteasas están implicadas en todas las etapas de la enfermedad cancerosa, desde el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales hasta la angiogénesis y las invasiones. Por lo tanto, pueden utilizarse para tratar el cáncer como desencadenantes selectivos de la activación hacia el sistema enlazador/carga útil. La presente divulgación se refiere a enlazadores que se pueden escindir mediante la acción de proteasas liberando así la carga útil libre (por ejemplo, exatecán). Las proteasas lisosomales, tales como la cathepsina B y las serina proteasas, tales como la cathepsina A o la tripeptidil-peptidasa I, se han estudiado ampliamente en el contexto del desarrollo de profármacos. También se sabe que las enzimas proteolíticas, tales como las caspasas, se utilizan como desencadenantes biológicos para la activación selectiva de la carga útil o para el suministro de carga específica a una célula diana, tal como una célula cancerosa.

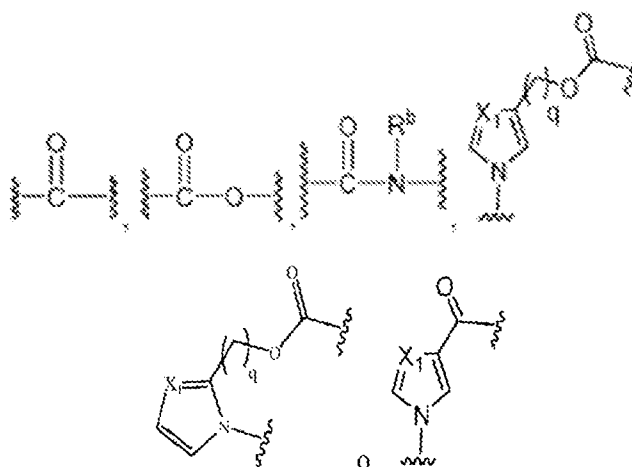
[0126] Un enlazador (o precursor del mismo) puede comprender un compuesto de Fórmula (I-A)



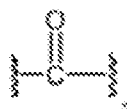
en la que: A es un dipéptido seleccionado del grupo que consiste en Val-Cit, Phe-Lys, Trp-Lys, Asp-Lys, Val-Lys, Val-Arg y Val-Ala, o A es un tetrapéptido seleccionado del grupo que consiste en Val-Phe-Gly-Sar, Val-Cit-Gly-Sar, Val-Lys-Gly-Sar, Val-Ala-Gly-Sar, Val-Phe-Gly-Pro, Val-Cit-Gly-Pro, Val-Lys-Gly-Pro, Val-Ala-Gly-Pro, Val-Cit-Gly-cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Val-Lys-Gly-cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Val-Phe-Gly-cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Val-Ala-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, Phe-Lys-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural, y Trp-Lys-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido con N-alquilo natural o no natural; R¹ y R² en cada caso son de manera independiente hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o alcoxi C₁₋₆ sustituido o no sustituido, o hidroxilo; R³ y R⁴ en cada caso son de manera independiente hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o alcoxi C₁₋₆ sustituido o no sustituido; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido; cicloalquilo C₃₋₇ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo C₅₋₆ sustituido o no sustituido, con la condición de que, cuando A es un dipéptido, R⁵ es H; R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ en cada caso es de manera independiente hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o cicloalquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido; X está ausente, -O-, -CO- o -NR^a-; Y está ausente,



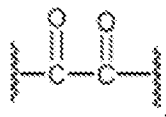
en el que el carbonilo en



está unido a Z₁, con la condición de que, cuando Y es

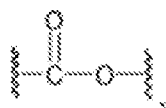


X está ausente y n es 1; con la condición de que, cuando Y es



5

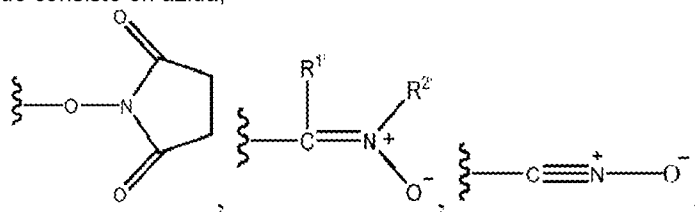
X está ausente y n es 0, con la condición de que, cuando Y es



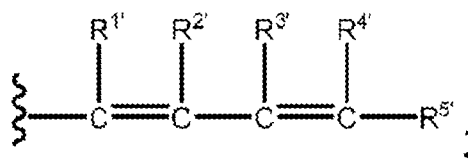
10

X está ausente y n es 0 o 1; con la condición de que, cuando X es $-\text{CO}-$, Y está ausente y n es 0; X_3 es $-\text{CH}-$; X_4 es $-\text{CH}-$; Z_1 es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en halo, hidroxilo, $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$, $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$, 4-nitrofenoxi, $-\text{COCl}$ y $-\text{COOH}$; Z_2 es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^c$ y $-\text{COOH}$; o Z_2 es $-\text{C(O)}-\text{T}_1$; T_1 es un polietilenglicol funcionalizado o una cadena de alquilo $\text{C}_5\text{-C}_6$ que tiene un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en azida,

15

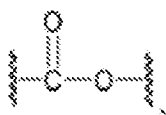


20 y



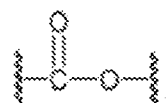
R^a , R^b y R^c en cada caso son de manera independiente hidrógeno o alquilo C_{1-6} sustituido o no sustituido; n es 0 o 1; y q es de 1 a 3. En ciertos aspectos de la Fórmula (I-A), A es Val-Lys; $\text{R}^1\text{-R}^5$ son cada uno de manera independiente hidrógeno; X está ausente; Y es

25



30

en el que el carbonilo en



35

está unido a Z; n es 1; X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son cada uno de manera independiente $-\text{CH}-$; Z_1 es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en halo, hidroxilo, $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$, $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$, 4-nitrofenoxi, $-\text{COCl}$ y $-\text{COOH}$; Z_2 es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^c$ y $-\text{COOH}$; o Z_2 es $-\text{C(O)}-\text{T}_1$, en el que T_1 es como se ha definido en la fórmula (I-A).

Composiciones farmacéuticas

[0127] La presente divulgación proporciona además una composición farmacéutica para tratar una enfermedad (por ejemplo, cáncer, tal como un cáncer asociado con un tumor que expresa el receptor de folato), en la que la composición comprende una cantidad eficaz de un NDC descrito en el presente documento.

[0128] En aspectos específicos de la presente divulgación, la composición farmacéutica que comprende los NDC se puede usar para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica) y leucemia mielógena crónica (CML). La composición farmacéutica que comprende los NDC también se puede usar para dirigirse a macrófagos asociados a tumores, por ejemplo, para modificar el estado inmunológico de un tumor en un sujeto.

[0129] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un portador, adyuvante, diluyente o vehículo no tóxico que no impacte negativamente en la actividad farmacológica de los NDC con los que se formula. Los excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en la fabricación de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son cualquiera de aquellos que son bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica, y pueden incluir diluyentes inertes, agentes dispersantes y/o granulados, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes tampón, agentes lubricantes y/o aceites. Los excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en la fabricación de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación a los mismos, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas (por ejemplo, albúmina sérica humana), sustancias tampón (por ejemplo, fosfatos), glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos (por ejemplo, mezclas de ácidos grasos vegetales saturados), agua, sales o electrolitos (por ejemplo, sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc), sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

[0130] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar por vía oral en forma de una forma farmacéutica de dosificación unitaria adecuada. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden preparar en muchas formas que incluyen comprimidos, cápsulas de gelatina duras o blandas, soluciones acuosas, suspensiones, liposomas y otras formulaciones de liberación lenta, tales como geles poliméricos moldeados.

[0131] Los modos de administración adecuados para los NDC o la composición incluyen, pero sin limitarse a los mismos, oral, intravenoso, rectal, sublingual, mucoso, nasal, oftálmico, subcutáneo, intramuscular, transdérmico, espinal, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática, intratumoral y otras vías adecuadas para la administración sistémica de principios activos.

[0132] La presente composición farmacéutica se puede administrar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, transdérmico (pasivo mediante parche, gel, crema, pomada o iontoforético); intravenoso (bolo, infusión); subcutáneo (infusión, depósito); transmucosa (bucal y sublingual, por ejemplo, comprimidos bucodispersables, obleas, películas y formulaciones efervescentes); conjuntival (gotas para los ojos); rectal (supositorio, enema); o intradérmico (bolo, infusión, depósito). La composición puede administrarse por vía tópica.

[0133] Las composiciones farmacéuticas líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas composiciones farmacéuticas líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

[0134] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosificación unitaria en ampollas, jeringas precargadas, recipientes de infusión (por ejemplo, recipientes para infusión de pequeño volumen) o recipientes multidosis que pueden contener un conservante añadido.

[0135] Las composiciones farmacéuticas pueden tomar formas, tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. De manera alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden estar en forma de polvo, obtenerse mediante aislamiento aséptico de un sólido estéril o mediante liofilización

de una solución, para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0136] Para administración tópica (por ejemplo, en la epidermis), las composiciones farmacéuticas se pueden formular como una pomada, crema o loción, o como el principio activo de un parche transdérmico. Se describen sistemas de administración transdérmica adecuados, por ejemplo, en A. Fisher et al. (Patente de Estados Unidos n° 4,788,603), y R. Bawa et al. (Patentes de Estados Unidos Nos. 4,931,279; 4,668,506; y 4,713,224). Las pomadas y cremas pueden formularse, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse mediante ionoforesis, por ejemplo, tal como se describe en la patente de Estados Unidos Nos. 4,140,122; 4,383,529; o 4,051,842.

[0137] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen formas de dosificación unitaria, tales como pastillas que comprenden una composición farmacéutica de la presente divulgación en una base aromatizada, tal como sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden la composición farmacéutica en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga; geles mucoadherentes y enjuagues bucales que comprenden la composición farmacéutica en un portador líquido adecuado.

[0138] Para la administración tópica en el ojo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de gotas, geles (S. Chrai et al, patente de Estados Unidos n.º 4,255,415), gomas (SL Lin et al, patente de Estados Unidos n.º 4,136,177) o mediante un inserto ocular de liberación prolongada (AS Michaels, patente de Estados Unidos n.º 3,867,519 y H.M. Haddad et al., patente de Estados Unidos n.º 3,870,791).

[0139] Cuando se desee, las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente se pueden adaptar para proporcionar una liberación sostenida de un compuesto terapéutico empleado, por ejemplo, mediante combinación con ciertas matrices poliméricas hidrófilas, por ejemplo, que comprenden geles naturales, geles poliméricos sintéticos o mezclas de los mismos.

[0140] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el portador es un sólido se presentan lo más preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Entre los portadores adecuados se incluyen manteca de cacao y otros materiales utilizados habitualmente en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla de la composición farmacéutica con el portador o portadores ablandados o fundidos, seguido de enfriamiento y conformación en moldes.

[0141] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen, además de las nanopartículas y el agente terapéutico, un portador. Dichos portadores son bien conocidos en la técnica.

[0142] Para la administración por inhalación, las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación se administran de manera conveniente desde un insufador, nebulizador o un paquete presurizado u otro medio conveniente para administrar un aerosol. Los paquetes presurizados pueden comprender un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.

[0143] De manera alternativa, para la administración por inhalación o insuflación, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden tomar la forma de una composición en polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo de la composición farmacéutica y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo se puede presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, en paquetes de gelatina o blíster desde los cuales se puede administrar el polvo con la ayuda de un inhalador o insufador.

[0144] Para la administración intranasal, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar mediante un aerosol líquido, tal como mediante un atomizador de botella de plástico. Entre ellos se encuentran el MISTOMETER® (inhalador de isoproterenol de Wintrop) y el MEDIHALER® (inhalador de isoproterenol de Riker).

[0145] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden contener otros adyuvantes, tales como saborizantes, colorantes, agentes antimicrobianos o conservantes.

[0146] Se entenderá además que la cantidad de las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el tratamiento variará no sólo con el agente terapéutico seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y afección de paciente y quedará, en última instancia, a discreción del médico o clínico tratante. Para las evaluaciones de estos factores, véase JF Brien et al.,

Europ. J.Clin. Pharmacol., 14, 133 (1978); y Physicians'Desk Reference, Charles E. Baker, Jr., Pub., Medical Economics Co., Oradell, Nueva Jersey (41.^a ed., 1987).

Administración y procedimientos de tratamiento

- 5 [0147] Los NDC de la presente divulgación se pueden administrar a un sujeto. El sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, ratas, conejos, simios, bovinos, ovinos, porcinos, caninos, felinos, animales de granja, animales deportivos, mascotas, equinos y primates.
- 10 [0148] Los NDC pueden administrarse a un sujeto mediante, pero sin limitación, las siguientes vías: oral, intravenosa, nasal, subcutánea, local, intramuscular o transdérmica. Por ejemplo, los NDC de la presente divulgación pueden administrarse a un sujeto por vía intravenosa.
- 15 [0149] Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación se pueden usar para ayudar a un médico o cirujano a identificar y caracterizar áreas de enfermedad, tales como cánceres, que incluyen, pero sin limitarse a los mismos, cánceres que sobreexpresan FR, para distinguir tejido enfermo y normal, tal como detectar márgenes tumorales que son difíciles de detectar usando un microscopio quirúrgico común, por ejemplo, en cirugía cerebral, para ayudar a dictar una intervención terapéutica o quirúrgica, por ejemplo, determinando si una lesión es cancerosa y debe extirparse o no es cancerosa y debe dejarse, o en la estadificación quirúrgica de una enfermedad.
- 20 [0150] Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación se pueden usar, pero sin limitarse a los mismos, para la detección de enfermedades metastásicas, la monitorización de la respuesta al tratamiento y la administración dirigida de carga útil, incluso pasando por la barrera hematoencefálica.
- 25 [0151] Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación también se pueden usar en la detección, caracterización y/o determinación de la localización de una enfermedad, incluyendo enfermedad temprana, la gravedad de una enfermedad o una afección asociada a la enfermedad, la estadificación de una enfermedad y/o monitorización de una enfermedad. La presencia, ausencia o nivel de una señal emitida puede ser indicativo de un estado de la enfermedad.
- 30 [0152] Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación también se pueden usar para monitorizar y/o guiar diversas intervenciones terapéuticas, tales como procedimientos quirúrgicos y basados en catéteres, y monitorizar la terapia con medicamentos, incluidas las terapias basadas en células. Los procedimientos de la presente divulgación también se pueden usar en el pronóstico de una enfermedad o afección patológica. Las subpoblaciones
- 35 celulares que residen dentro o marginan el sitio de la enfermedad, tales como células similares a células madre ("células madre cancerosas") y/o células inflamatorias/fagocíticas, pueden identificarse y caracterizarse usando los procedimientos y composiciones de la presente divulgación.
- 40 [0153] Con respecto a cada uno de los anteriores, entre los ejemplos de dichas enfermedades o afecciones patológicas que pueden detectarse o monitorizarse (antes, durante o después de la terapia) se incluyen cáncer (por ejemplo, melanoma, cáncer de tiroides, colorrectal, ovario, pulmón, mama, próstata, cuello uterino, piel, cerebro, gastrointestinal, boca, riñón, esófago, huesos), que puede usarse para identificar sujetos que tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer y/o neoplasias malignas, es decir, que están predispuestos a desarrollar cáncer y/o neoplasias malignas, inflamación (por ejemplo, afecciones inflamatorias inducidas por la presencia de lesiones cancerosas), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis y afecciones inflamatorias de los vasos sanguíneos, isquemia, accidente cerebrovascular, trombosis), enfermedades dermatológicas (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, psoriasis), enfermedad oftálmica (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética), enfermedad infecciosa (por ejemplo, infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, incluido el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)), enfermedad inmunológica (por ejemplo, un trastorno autoinmune, linfoma,
- 45 esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus), enfermedades del sistema nervioso central (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer), enfermedades hereditarias, enfermedades metabólicas, enfermedades ambientales (por ejemplo, envenenamiento por plomo, mercurio y radiactividad, cáncer de piel), enfermedades relacionadas con los huesos (por ejemplo, osteoporosis, tumores óseos primarios y metastásicos, osteoartritis) y una enfermedad neurodegenerativa.
- 50 [0154] Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación, por lo tanto, se pueden usar, por ejemplo, para determinar la presencia y/o localización de células tumorales y/o similares a células madre corresponsables ("células madre cancerosas"), la presencia y/o localización de células inflamatorias, incluida la presencia de macrófagos activados, por ejemplo en regiones peritumorales, la presencia y localización de enfermedades vasculares, incluidas áreas con riesgo de oclusión aguda (es decir, placas vulnerables) en arterias coronarias y periféricas, regiones de aneurismas en expansión, placa inestable en las arterias carótidas y áreas isquémicas. Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación también se pueden usar en la identificación y evaluación de muerte celular, lesión, apoptosis, necrosis, hipoxia y angiogénesis (documento PCT/US2006/049222).
- 60 [0155] Los procedimientos de la presente divulgación comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un NDC descrito en el presente documento. Por ejemplo, el NDC se puede administrar al sujeto que lo
- 65

necesita por vía intravenosa. Una "cantidad eficaz" es una cantidad de NDC que provoca una respuesta biológica o medicinal deseada en las condiciones de administración, tales como una cantidad que reduce los signos y/o síntomas de una enfermedad o trastorno que se está tratando, por ejemplo, reduce el tamaño del tumor o carga tumoral. La cantidad real administrada puede ser determinada por un médico habitualmente experto basándose, por ejemplo, en la edad, el peso, el sexo, la salud general y la tolerancia a los fármacos del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de dosificación seleccionada, la vía de administración y otros factores.

[0156] En aspectos específicos del procedimiento, el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica) y leucemia mielógena crónica (CML).

[0157] La presente divulgación también incluye el uso de NDC para tratar un tumor que expresa un receptor de folato. Por ejemplo, el uso de NDC puede comprender la administración al sujeto que lo necesita por vía intravenosa.

[0158] La presente divulgación también se refiere al uso de NDC en un sujeto con cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica) y leucemia mielógena crónica (CML).

[0159] Los NDC de la presente divulgación también se pueden usar en la fabricación de un medicamento para tratar un tumor que expresa el receptor de folato, en la que el NDC se administra al sujeto que lo necesita por vía intravenosa y en la que el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto y cáncer de estómago), cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML, por ejemplo, AML pediátrica) y leucemia mielógena crónica (CML).

[0160] Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir composiciones y procedimientos que incluyen la administración de un NDC, tal como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más agentes contra el cáncer adicionales. En tales circunstancias, el NDC puede administrarse antes, sustancialmente al mismo tiempo que o después del agente o agentes adicionales. Entre los agentes adicionales adecuados se incluyen, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, tales como mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida, busulfán, N-nitroso-N-metilurea, carmustina, lomustina, semustina, fotemustina, estreptozotocina, dacarbazina, mitozolomida, temozolomida, tiotepa, mitomicina, diaziquona, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, procarbazona, hexametilmelamina, metotrexato, pemetrexed, fluorouracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo), capecitabina, citarabina, gemcitabina, decitabina, azacitidina, fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina, pentostatina, tioguanina, mercaptopurina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, vinflunina, paclitaxel, docetaxel, irinotecán, topotecán, camptotecina, etopósido, mitoxantrona, tenipósido, novobiocina, merbarona, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, pirarubicina, aclarubicina, mitomicina C, actinomicina, bleomicina, bisantreno, gemcitabina, citarabina y similares. Otros agentes contra el cáncer que se pueden usar con un NDC en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento incluyen inhibidores de puntos de control inmunológico (por ejemplo, anticuerpos anti-PD1, anti-PDL1, anti-CTLA4), antagonistas de receptores hormonales, otros conjugados quimioterapéuticos (por ejemplo, en forma de conjugados de anticuerpo-fármaco, conjugados de fármaco y nanopartículas y similares), y similares.

[0161] La terminología utilizada en la descripción de la presente invención en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante de la presente invención. Tal como se utiliza en la descripción de las realizaciones de la presente invención y las reivindicaciones adjuntas, se pretende que las formas singulares de "un", "una" y "el" y "la" incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se utiliza en el presente documento, "y/o" se refiere y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados.

[0162] El término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor significa $\pm 20\%$, o $\pm 10\%$. Además, el término "aproximadamente" cuando se usa en conexión con uno o más números o intervalos numéricos, debe entenderse que se refiere a todos dichos números, incluidos todos los números en un intervalo y modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. La mención de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números, por ejemplo, números enteros completos, incluidos fracciones de los mismos, subsumas dentro de ese intervalo (por ejemplo, la mención de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4 y 5, así como fracciones del mismo, por ejemplo, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 y similares) y cualquier intervalo dentro de ese intervalo.

[0163] A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "comprenden", "comprende" y "que comprende" se utilizan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera lo contrario. Asimismo, el término "incluir" y sus variantes gramaticales pretenden ser no limitativos, de modo que la mención de elementos en una lista no excluye otros elementos similares que pueden sustituirse o agregarse a los elementos enumerados.

[0164] Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se usan en un sentido genérico y descriptivo únicamente y no con fines de limitación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la materia descrita en el presente documento.

[0165] Se entenderá que en la descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas, las abreviaturas y nomenclatura empleadas son aquellas que son estándar en la química de aminoácidos y péptidos.

ABREVIATURAS

[0166] Las abreviaturas utilizadas en la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, son las siguientes:

Fmoc: Fluorenilmetoxycarbonilo

MeOH: Metanol

Cit-OH: L-Citrulina

DCM: Diclorometano

EEDQ: 2-etoxi-1-(etoxicarbonil)-1,2-dihidroquinolina

THF: Tetrahidrofurano

RMN: Resonancia magnética nuclear

DMSO: Dimetilsulfóxido

LCMS: Cromatografía líquida-Espectrometría de masas

TEA: Trietilamina

HATU: 3-óxido hexafluorofosfato de (1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio

DMF: Dimetilformamida

DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina

TMSCN: Cianuro de trimetilsililo

RP HPLC: Cromatografía líquida de alta presión en fase inversa

SFC: Cromatografía de fluidos supercríticos

CAN: Acetonitrilo

NMP: N-metilpirrolidona

ta: temperatura ambiente

TEA: Trietilamina

TFA: Ácido trifluoroacético

MTBE: metil terc-butil éter

EtOAC: acetato de etilo

PyBOP: (Hexafluorofosfato de benzotrizol-1-il-oxitripirrolidinanofosfonio)

DEFINICIONES

[0167] Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático monovalente que puede comprender de 1 a 18 átomos de carbono, tal como de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, o de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono ("alquilo C₁₋₁₈"). Un grupo alquilo puede ser de cadena lineal, de cadena ramificada, de un resto monocíclico o de un resto policíclico o combinaciones de los mismos. Entre los ejemplos de grupos alquilo se incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, norbornilo y similares. Cada caso de un grupo alquilo puede estar de manera independiente de manera opcional sustituido, es decir, no sustituido (un "alquilo no sustituido") o sustituido (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes, por ejemplo, de 1 a 5 sustituyentes, de 1 a 3 sustituyentes o 1 sustituyente.

[0168] Tal como se usa en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 18 átomos de carbono, uno o más dobles enlaces carbono-carbono y ningún triple enlace ("alqueno C₂₋₁₈"). Un grupo alqueno puede tener de 2 a 8 átomos de carbono, de 2 a 6 átomos de carbono, de 2 a 5 átomos de carbono, de 2 a 4 átomos de carbono o de 2 a 3 átomos de carbono. Los uno o más dobles enlaces carbono-carbono pueden ser internos (tal como en 2-butenilo) o terminales (tal como en 1-butenilo). Entre los ejemplos de grupos alqueno se incluyen etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, butadienilo, pentenilo, pentadienilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, octatrienilo y similares. Cada caso de un grupo alqueno puede estar de manera independiente de manera opcional sustituido, es decir, no sustituido (un "alqueno no sustituido") o sustituido (un "alqueno sustituido") con uno o más sustituyentes, por ejemplo, de 1 a 5 sustituyentes, de 1 a 3 sustituyentes o 1 sustituyente.

[0169] Tal como se usa en el presente documento, el término "alquino" se refiere a un grupo hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 18 átomos de carbono, y uno o más triples enlaces

carbono-carbono ("alquinilo C₂₋₁₈"). El grupo alquinilo puede tener de 2 a 8 átomos de carbono, de 2 a 6 átomos de carbono, de 2 a 5 átomos de carbono, de 2 a 4 átomos de carbono o de 2 a 3 átomos de carbono. Los uno o más triples enlaces carbono-carbono pueden ser internos (tal como en 2-butinilo) o terminales (tal como en 1-butinilo). Entre los ejemplos de grupos alquinilo se incluyen etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo y similares. Cada caso de un grupo alquinilo puede estar de manera independiente de manera opcional sustituido, es decir, no sustituido (un "alquinilo no sustituido") o sustituido (un "alquinilo sustituido") con uno o más sustituyentes, por ejemplo, de 1 a 5 sustituyentes, de 1 a 3 sustituyentes, o 1 sustituyente.

[0170] Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroalquilo" se refiere a una cadena lineal o ramificada estable no cíclica, o combinaciones de las mismas, que incluyen al menos un átomo de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, P, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar de manera opcional oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar de manera opcional cuaternizado. El heteroátomo o heteroátomos O, N, P, S y Si pueden estar colocados en cualquier posición del grupo heteroalquilo.

[0171] Los términos "alquilenilo", "alquenileno", "alquinileno" o "heteroalquilenilo", solos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un radical divalente derivado de un alquilo, alquenilo, alquinilo o heteroalquilo, respectivamente. El término "alquenileno", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical divalente derivado de un alqueno. Un grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno o heteroalquilenilo puede describirse como, por ejemplo, un alquilenilo de C₁₋₆ miembros, un alquenileno de C₁₋₆ miembros, un alquinileno de C₁₋₆ miembros o un heteroalquilenilo de C₁₋₆ miembros, en el que el término "miembros" se refiere a los átomos distintos de hidrógeno dentro del resto. En el caso de grupos heteroalquilenilo, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxo, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Aún más, para los grupos de enlace alquilenilo y heteroalquilenilo, la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de enlace no implica ninguna orientación del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R⁻ puede representar tanto -C(O)₂R⁻ como -R⁻C(O)₂. Cada caso de un grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno o heteroalquilenilo puede estar de manera independiente de manera opcional sustituido, es decir, no sustituido (un "alquilenilo no sustituido") o sustituido (un "heteroalquilenilo sustituido") con uno o más sustituyentes.

[0172] Tal como se usan en el presente documento, los términos "alquilo sustituido", "alquenilo sustituido", "alquinilo sustituido", "heteroalquilo sustituido", "heteroalquenilo sustituido", "heteroalquinilo sustituido", "cicloalquilo sustituido", "heterociclilo sustituido", "arilo sustituido" y "heteroarilo sustituido" se refieren a restos alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, respectivamente, que tienen sustituyentes que reemplazan uno o más átomos de hidrógeno en uno o más carbonos o heteroátomos del resto. Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, amino (que incluye alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (que incluye alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo o un resto aromático o heteroaromático. Los cicloalquilos pueden estar sustituidos adicionalmente, por ejemplo, con los sustituyentes descritos anteriormente.

[0173] Tal como se usa en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere a un grupo de fórmula -O-alquilo. El término "alcoxi" o "alcoxilo" incluye grupos alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos y no sustituidos unidos de manera covalente a un átomo de oxígeno. Entre los ejemplos de grupos alcoxi o radicales alcoxilo se incluyen, pero sin limitarse a estos, grupos metoxi, etoxi, isopropiloxi, propoxi, butoxi y pentoxi. Entre los ejemplos de grupos alcoxi sustituidos se incluyen grupos alcoxi halogenados. Los grupos alcoxi pueden estar sustituidos con grupos, tales como alquenilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, amino (que incluye alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (que incluye alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo o restos aromáticos o heteroaromáticos. Entre los ejemplos de grupos alcoxi sustituidos con halógeno se incluyen, pero sin limitarse a estos, fluorometoxi, difluorometoxi, trifluorometoxi, clorometoxi, diclorometoxi y triclorometoxi.

[0174] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos estable, que puede ser monocíclico o policíclico, del cual todos los átomos del anillo son carbono, y que puede estar sustituido o no sustituido. El sistema de anillos aromáticos puede tener, por ejemplo, de 3 a 7 átomos en el anillo. Los ejemplos incluyen fenilo, bencilo, naftilo, antracilo y similares. Cada caso de un grupo arilo puede estar de manera independiente de manera opcional sustituido, es decir, no sustituido (un "arilo no sustituido") o sustituido (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes.

[0175] Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo arilo que incluye uno o más heteroátomos del anillo. Por ejemplo, un heteroarilo puede incluir un anillo heterocíclico aromático monocíclico de 5, 6 o 7 miembros o bicíclico de 7, 8 o 9 miembros estables que consiste en átomos de carbono y uno o más heteroátomos, seleccionados de manera independiente de entre el grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El átomo de nitrógeno puede estar sustituido o no sustituido (por ejemplo, N o NR₄, en el que R₄ es H u otros sustituyentes, tal como se define). Entre los ejemplos de grupos heteroarilo se incluyen pirrol, furano, indol, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isoxazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina y similares.

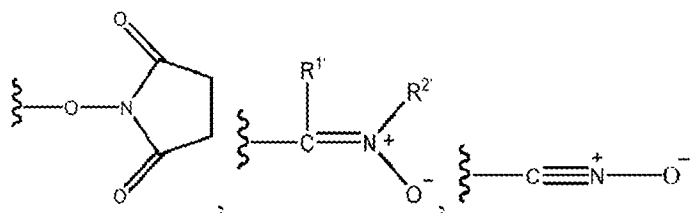
[0176] Tal como se usan en el presente documento, los términos "cicloalquileno", "heterociclileno", "arileno" y "heteroarileno", solos o como parte de otro sustituyente, significan un radical divalente derivado de un cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, respectivamente. Cada caso de cicloalquileno, heterociclileno, arileno o heteroarileno puede estar de manera independiente de manera opcional sustituido, es decir, no sustituido (un "arileno no sustituido") o sustituido (un "heteroarileno sustituido") con uno o más sustituyentes.

[0177] Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que el término "cicloalquilo" incluya anillos de hidrocarburos cíclicos no aromáticos, tales como anillos de hidrocarburos que tienen de tres a ocho átomos de carbono en su estructura de anillo. Cicloalquilo puede incluir ciclobutilo, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. El grupo cicloalquilo puede ser monocíclico ("cicloalquilo monocíclico") o contener un sistema de anillos fusionados, con puente o espiro, tal como un sistema bicíclico ("cicloalquilo bicíclico") y puede estar saturado o parcialmente insaturado. "Cicloalquilo" también incluye sistemas de anillos en los que el anillo cicloalquilo, tal como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo, en los que el punto de unión está en el anillo cicloalquilo, y en tales casos, el número de carbonos continúa designando el número de carbonos en el sistema de anillos cicloalquilo. Cada caso de un grupo cicloalquilo puede estar de manera independiente de manera opcional sustituido, es decir, no sustituido (un "cicloalquilo no sustituido") o sustituido (un "cicloalquilo sustituido") con uno o más sustituyentes.

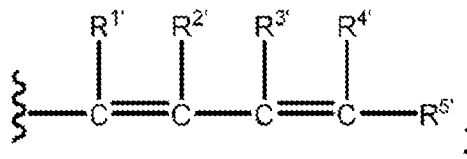
[0178] Tal como se usa en el presente documento, el término "heterociclilo" se refiere a una estructura molecular cíclica monovalente que comprende átomos de al menos dos elementos diferentes en el anillo o anillos (es decir, un radical de un anillo heterocíclico). Se hace referencia adicional a: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, Oxford, 1997 como prueba de que anillo heterocíclico es un término bien establecido en el campo de la química orgánica.

[0179] Tal como se usa en el presente documento, el término "dipéptido" se refiere a un péptido que está compuesto de dos residuos de aminoácidos, que pueden indicarse en el presente documento como -A₁-A₂-. Por ejemplo, los dipéptidos empleados en la síntesis de conjugados de carga útil y enlazador escindible por proteasa de la presente divulgación se pueden seleccionar del grupo que consiste en Val-Cit, Phe-Lys, Trp-Lys, Asp-Lys, Val-Lys y Val-Ala.

[0180] Tal como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol funcionalizado" se refiere al polietilenglicol que comprende un grupo funcional. Por ejemplo, un polietilenglicol funcionalizado puede ser polietilenglicol funcionalizado con un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en azida,

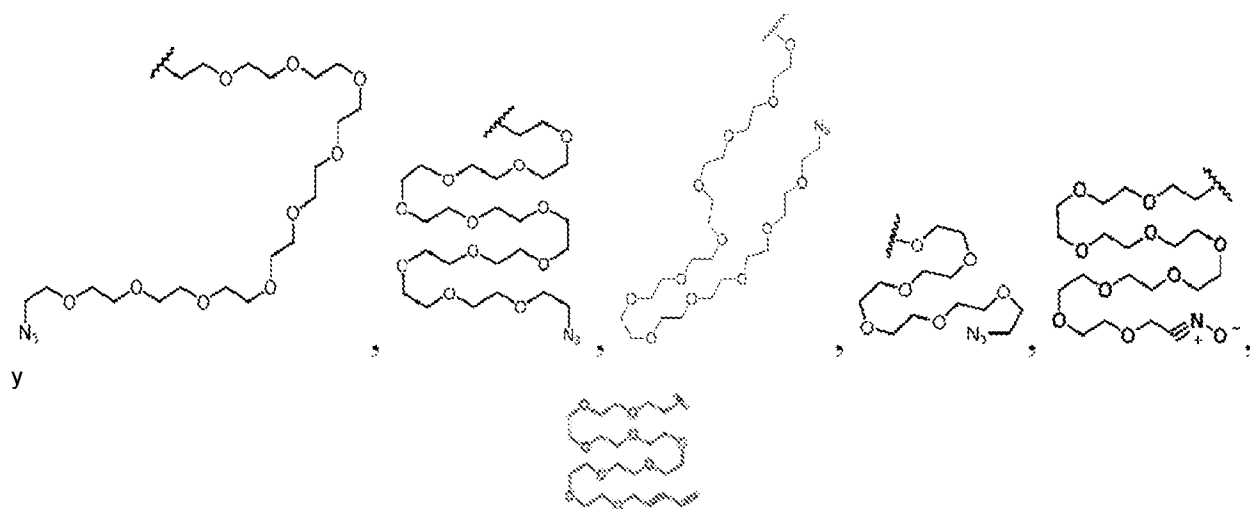


y



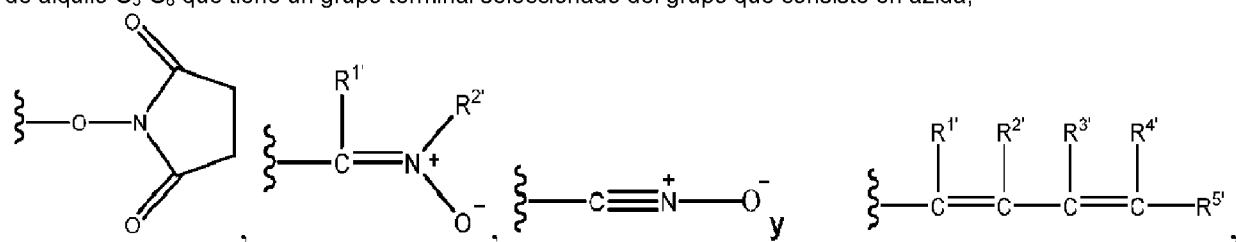
en las que R^{1'}, R^{2'}, R^{3'}, R^{4'} y R^{5'} en cada caso es de manera independiente hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o cicloalquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido. En aspectos preferidos, R^{1'}, R^{2'}, R^{3'}, R^{4'} y R^{5'} en cada caso es hidrógeno. En aspectos preferidos, R^{1'}, R^{2'}, R^{3'}, R^{4'} y R^{5'} en cada caso es metilo.

[0181] En algunos aspectos de la presente divulgación, el término "polietilenglicol funcionalizado" se refiere, pero no se limita a, las siguientes estructuras.



5

[0182] Tal como se usa en el presente documento, T_i puede referirse a un polietilenglicol funcionalizado o una cadena de alquilo C₅-C₆ que tiene un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en azida,



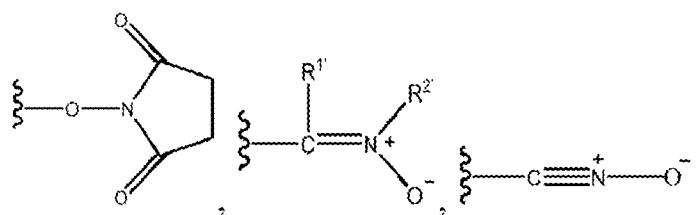
10

en las que R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ en cada caso son de manera independiente hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o cicloalquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido. En aspectos preferidos de T₁, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ en cada caso es hidrógeno. En aspectos preferidos de T₁, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ en cada caso es metilo. En aspectos preferidos, T_i es un polietilenglicol funcionalizado que tiene un grupo terminal azida. En aspectos preferidos, T₁ es una cadena alquilo C₅-C₆ que tiene un grupo terminal azida. La unidad repetida (-O-CH₂-CH₂-) de polietilenglicol (PEG) puede oscilar entre 5 y 20 unidades, preferiblemente entre 5 y 15 unidades y más preferiblemente entre 6 y 12.

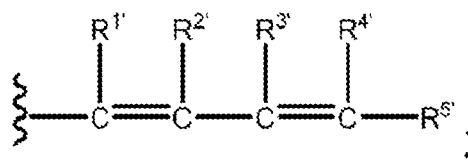
15

[0183] Tal como se usa en el presente documento, T₁ puede referirse a una cadena de alquilo C₅-C₆ que tiene un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en azida,

20



25 y



en las que R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ en cada caso es de manera independiente hidrógeno, alquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido o cicloalquilo C₁₋₆ sustituido o no sustituido. En aspectos preferidos, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ en cada caso es hidrógeno. En aspectos preferidos, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ en cada caso es metilo.

30

[0184] El PEG monofuncionalizado terminado en azida y la cadena de alquilo C₅-C₆ monofuncionalizada terminado en azida se pueden preparar a partir de PEG usando procedimientos conocidos y reactivos adecuados, tales como los descritos en los esquemas proporcionados en el presente documento.

[0185] Tal como se usa en el presente documento, el término "halo" o "halógeno" se refiere a F, Cl, Br o I.

[0186] Un grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, por ejemplo, alquilo, alquenilo, aquinilo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, amino (que incluye alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (que incluye alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrido, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfonilo, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático.

[0187] Tal como se usa en el presente documento, el término "hidroxi" se refiere a un grupo de fórmula -OH.

[0188] Tal como se usa en el presente documento, el término "hidroxilo" se refiere a un radical hidroxilo (.OH).

[0189] Tal como se usa en el presente documento, la frase "de manera opcional sustituido" significa no sustituido o sustituido. En general, el término "sustituido" significa que al menos un hidrógeno presente en un grupo (por ejemplo, un átomo de carbono o nitrógeno) se reemplaza con un sustituyente permisible, por ejemplo, un sustituyente que tras la sustitución da como resultado un compuesto estable. El término "sustituido" puede incluir sustitución con todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos, tales como cualquiera de los sustituyentes descritos en el presente documento que dan como resultado la formación de un compuesto estable. Para los fines de la presente divulgación, los heteroátomos, tales como el nitrógeno, pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente adecuado, tal como se describe en el presente documento, que satisfaga las valencias de los heteroátomos y dé como resultado la formación de un resto estable.

[0190] Tal como se usa en el presente documento, el término "tetrapéptido" se refiere a un péptido que está compuesto de cuatro residuos de aminoácidos, que pueden indicarse en el presente documento como -A₁-A₂-A₃-A₄-. Los tetrapéptidos empleados en la síntesis de conjugados de carga útil-enlazador escindible por proteasa de la presente divulgación se seleccionan del grupo que consiste en Val-Phe-Gly-Sar, Val-Cit-Gly-Sar, Val-Lys-Gly-Sar, Val-Ala-Gly-Sar, Val-Phe-Gly-Pro, Val-Cit-Gly-Pro, Val-Lys-Gly-Pro, Val-Ala-Gly-Pro, Val-Cit-Gly-cualquier alfa aminoácido sustituido por N-alquilo natural o no natural, Val-Lys-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido por N-alquilo natural o no natural, Val-Phe-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido por N-alquilo natural o no natural, Val-Ala-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido por N-alquilo natural o no natural, Phe-Lys-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido por N-alquilo natural o no natural y Trp-Lys-Gly- cualquier alfa aminoácido sustituido por N-alquilo natural o no natural.

[0191] Además, un experto en la técnica entenderá que los procedimientos sintéticos, tal como se describen en el presente documento, utilizan una variedad de grupos protectores. Tal como se usa en el presente documento, el término "grupo protector" se refiere a un resto funcional particular, por ejemplo, O, S o N, que está bloqueado temporalmente de modo que se pueda llevar a cabo una reacción selectivamente en otro sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores se pueden introducir y eliminar en etapas apropiadas durante la síntesis de un compuesto usando procedimientos que son conocidos por un experto en la técnica. Los grupos protectores se aplican según procedimientos estándar de síntesis orgánica, tal como se describe en la literatura (Theodora W. Greene y Peter GM Wuts (2007) *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 4^a edición, John Wiley and Sons).

[0192] Entre los grupos protectores de ejemplo se incluyen, pero no se limitan a, grupos protectores de oxígeno, azufre, nitrógeno y carbono. Por ejemplo, entre los grupos protectores de oxígeno se incluyen, pero no se limitan a, éteres metílicos, éteres metílicos sustituidos (por ejemplo, MOM (metoximetil éter), MTM (metiltiometil éter), BOM (benciloximetil éter), PMBM (pimetoxibenciloximetil éter), éteres etílicos opcionalmente sustituidos, éteres bencílicos opcionalmente sustituidos, éteres silílicos (por ejemplo, TMS (éter trimetilsilílico), TES (éter trietilsilílico), TIPS (éter triisopropilsilílico), TBDMS (éter t-butildimetilsilílico), éter tribencilsilílico, TBDPS (éter t-butildifenilsilílico), ésteres (por ejemplo, formiato, acetato, benzoato (Bz), trifluoroacetato, dicloroacetato), carbonatos, acetales cíclicos y cetales. Además, entre los grupos protectores de nitrógeno se incluyen, pero no se limitan a, carbamatos (que incluyen carbamatos de metilo, etilo y etilo sustituidos (por ejemplo, Troc), amidas, derivados de imida cíclica, N-alquil y N-aril aminas, derivados de imina y derivados de enamina, etc. Entre los grupos protectores de amino se incluyen, pero no se limitan a, fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), terc-butiloxycarbonilo (Boc), carboxibencilo (Cbz), acetamida, trifluoroacetamida, etc. En el presente documento se detallan otros grupos protectores de ejemplo, sin embargo, se apreciará que la presente divulgación no pretende limitarse a estos grupos protectores; más bien, se puede utilizar una variedad de grupos protectores equivalentes adicionales según procedimientos conocidos por un experto en la técnica, pero no se limitan a fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), terc-butiloxycarbonilo (Boc), carboxibencilo (Cbz),

acetamida, trifluoroacetamida, etc. En el presente documento se detallan otros grupos protectores de ejemplo, sin embargo, se entenderá que la presente divulgación no pretende limitarse a estos grupos protectores; más bien, se puede utilizar una variedad de grupos protectores equivalentes adicionales según procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

[0193] A lo largo de la presente divulgación, un conjugado de fármaco y nanopartícula (NDC) a veces puede denominarse CDC (conjugado de fármaco y C'Dot), por ejemplo, FA-CDC.

[0194] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor las realizaciones de la presente invención, pero no pretenden limitar el alcance de la presente invención. Si bien son habituales de los que podrían usarse, alternativamente se pueden usar otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

EJEMPLOS

[0195] Para que la divulgación y la invención descritas en el presente documento puedan entenderse de manera más completa, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar los procedimientos y las nanopartículas funcionalizadas proporcionadas en este documento y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de su alcance.

[0196] Los compuestos proporcionados en el presente documento se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando modificaciones a los protocolos de síntesis específicos establecidos a continuación que serían bien conocidos por los expertos en la técnica. Se entenderá que cuando se proporcionan condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, disolventes, presiones, etc.), también se pueden usar otras condiciones de proceso, a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o disolventes particulares utilizados, pero los expertos en la técnica pueden determinar dichas condiciones mediante procedimientos de optimización de rutina.

[0197] Además, tal como resultará evidente para los expertos en la técnica, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales para evitar que ciertos grupos funcionales experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional particular, así como las condiciones adecuadas para la protección y desprotección, son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se describen numerosos grupos protectores y su introducción y eliminación en Greene et al. *Protecting Groups in Organic Synthesis*, segunda edición, Wiley, Nueva York, 1991, y las referencias citadas en dicho documento.

Procedimientos generales

[0198] Los procedimientos útiles para preparar los compuestos descritos en el presente documento se exponen en los siguientes ejemplos y se generalizan aquí. Un experto en la técnica reconocerá que estos ejemplos se pueden adaptar para preparar los conjugados de enlazador-carga útil, enlazadores y cargas útiles y sus sales farmacéuticamente aceptadas de los mismos según la presente divulgación. En las reacciones descritas, los grupos funcionales reactivos, tales como grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, pueden protegerse, cuando se desee, por ejemplo, para evitar reacciones no deseadas. También se pueden usar grupos protectores convencionales de acuerdo con prácticas y técnicas de síntesis estándar. Los materiales necesarios para sintetizar los nuevos enlazadores que contienen cargas útiles, tales como el exatecán, se obtuvieron comercialmente y sus análogos correspondientes se preparan tal como se describe en los siguientes ejemplos.

[0199] Los reactivos se adquirieron de proveedores comerciales (Combi-Blocks/SIGMA-ALDRICH) y se usaron sin purificación adicional. Todas las reacciones no acuosas se realizaron en material de vidrio seco a la llama bajo una presión positiva de argón. Los disolventes anhidros se adquirieron de proveedores comerciales (RANKEM). Todos los aminoácidos, tales como Cit, Val, Phe, Lys, Trp, Asp, son aminoácidos naturales con configuración S. En varios ejemplos, también se pueden usar tetrapéptidos y aminoácidos no naturales. La cromatografía ultrarrápida se realizó en gel de sílice de malla 230-400 con los sistemas de disolventes indicados. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones se registraron en un espectrómetro Bruker a 400 MHz utilizando DMSO como disolvente. Las posiciones de los picos se indican en partes por millón de campo bajo a partir del tetrametilsilano como patrón interno. Los valores J se expresan en hercios. Los análisis de masas se realizaron en un espectrómetro (Agilent/Shimadzu) utilizando la técnica de electropulverización (ES). Los análisis de HPLC se realizaron en (Agilent/Waters), un detector PDA-UV equipado con un Gemini C-18 (1000 x 4,6 mm; 5 μ) y se determinó que todos los compuestos analizados tenían >95 % de pureza utilizando este procedimiento. Tal como se puede observar en muchos conjugados de carga útil-enlazador escindible por proteasa, se aislaron dos picos al final de la reacción. El Pico-A (o Pico-1) es el compuesto deseado con la estereoquímica tal como se muestra.

[0200] Los compuestos preparados según los procedimientos descritos en el presente documento se pueden aislar mediante procedimientos de HPLC preparativa. A continuación, se proporcionan condiciones y procedimientos de HPLC representativos:

Agilent UPLC-MS; Columna: Columna YMC Triart C18 (2,1 x 33 mm, 3 μ)

Condiciones de gradiente: Caudal: 1,0 ml/min; temperatura de la columna: 50 °C; Disolvente A: HCOOH al 0,01 % en agua y Disolvente B: HCOOH al 0,01 % en CH₃CN; Fase móvil: 95 % [HCOOH al 0,01 % en agua] y 5 % [HCOOH al 0,01 % en CH₃CN] mantenido durante 0,50 min, a continuación, hasta 1 % [HCOOH al 0,01 % en agua] y 99 % [HCOOH al 0,01 % en CH₃CN] en 3,00 min, se mantuvieron estas condiciones hasta 4,00 min y finalmente se volvió a la condición inicial en 4,10 min y se mantuvieron durante 4,50 min (Tabla 1).

Tabla 1: Condiciones de gradiente de HPLC.

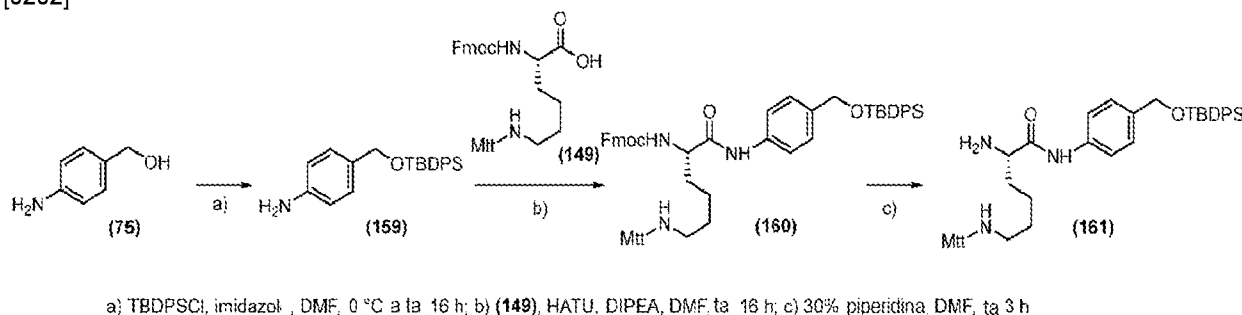
TIEMPO	MÓDULO	% A	% B
0,00	Bombas	95	5
0,50	Bombas	95	5
3,00	Bombas	1	99
4,00	Bombas	1	99
4,10	Bombas	95	5
4,50	Bombas	95	5

Ejemplo 1: Síntesis de precursores de conjugados de exatecán-enlazador

[0201] Los precursores del conjugado de exatecán-enlazador adecuados para preparar un NDC de la presente divulgación se pueden sintetizar según los siguientes protocolos. Como los precursores del conjugado exatecán-enlazador comprenden un grupo azida terminal, son adecuados para unirse a una nanopartícula funcionalizada con restos de alquino (por ejemplo, DBCO), utilizando química de clic.

Síntesis de (S)-2-amino-N-(4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)-6-((difenil(p toli)metil)amino)hexanamida (161)

[0202]



Esquema 2: Síntesis de compuesto (161)

[0203] *Síntesis de 4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)anilina (159):* Se añadió imidazol (5,54 g, 81,22 mmol) a una solución de (4-aminofenil)metanol (75) (5,0 g, 40,61 mmol) en DMF (25 ml) a 0 °C, seguido de terc-butyl(cloro)difenilsilano (13,39 g, 48,73 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se inactivó con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna usando gel de sílice (malla 230-400) eluyendo con EtOAc al 10 % en éter de petróleo para proporcionar 4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)anilina (159; 6,6 g) como una goma. LCMS: m/z 362,31 [(M+H)⁺]; Rt: 2,58 min; 93,68 % de pureza.

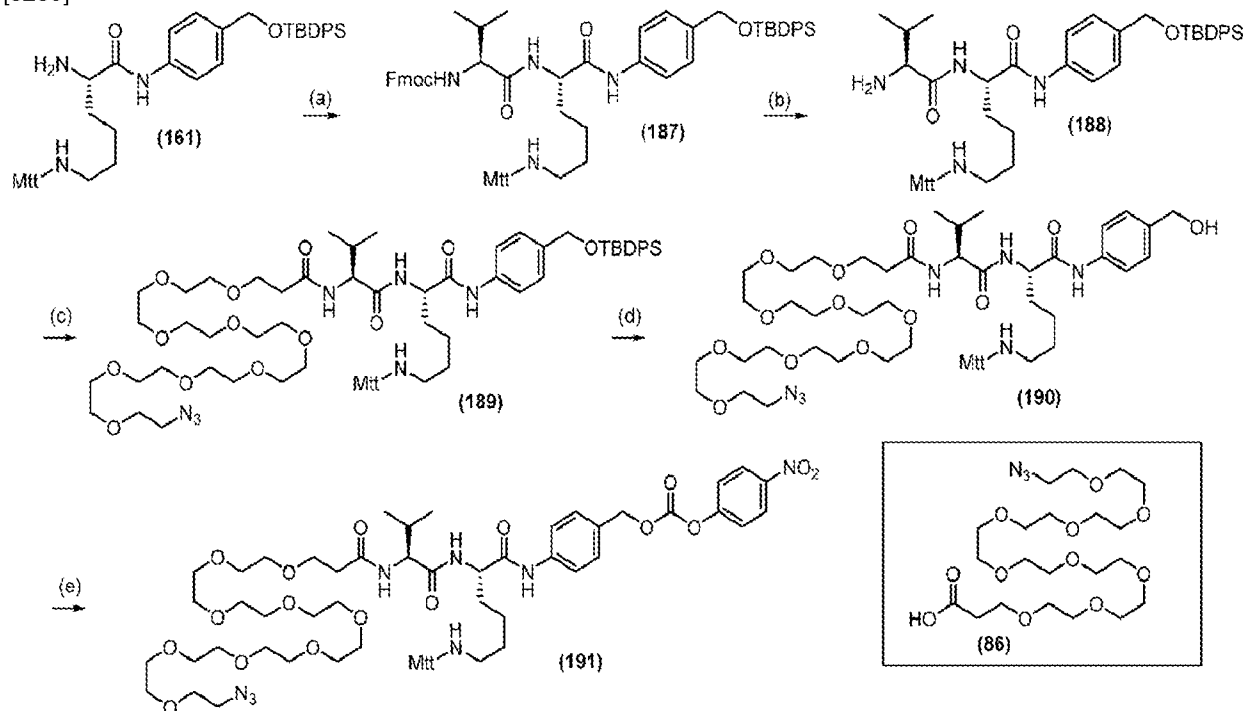
[0204] *Síntesis de (S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (160):* Se añadieron diisopropiletilamina (4,18 ml, 24 mmol), HATU (6,08 g, 16 mmol) y 4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)anilina (159) (2,89 g, 8 mmol) a una solución de N2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-N6-(difenil(p-tolil)metil)-L-lisina (149) (5,0 g, 8 mmol) en DMF (50 ml) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de agotar el material de partida, la mezcla de reacción se inactivó con agua helada. El sólido precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar (S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (160; 5,5 g) como un sólido. LCMS: m/z 990,37 [(M+H)⁺]; Rt: 2,84 min; 96,79 % de pureza.

[0205] *Síntesis de (S)-2-amino-N-(4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)hexanamida (161):* Se añadió piperidina (16,5 ml) a una solución de (S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (160) (5,5 g, 5,68 mmol) en DMF (38,5 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de agotar el material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna usando gel de sílice (malla 230-400)

eluyendo con EtOAc al 100 % para proporcionar (S)-2-amino-N-(4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)hexanamida (**160**; 3,5 g) como una goma. LCMS: m/z 744,24 [(M-H)⁻]; Rt: 2,20 min; 90,16 % de pureza.

- 5 Síntesis de (4-nitrofenil)carbonato de 4-((32S,35S)-1-azido-35-(4-((difenil(p-tolil)metil)amino)butil)-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazaheptatriacontan-36-amido)bencilo (**191**).

[0206]



(a) Fmoc-Val-OH, HATU, DIPEA, DMF, TA; (b) Piperidina, DMF, 0 °C a TA; (c) Ácido azido-PEGs (**86**), HATU, DIPEA, DMF, TA; (d) NH₄F, MeOH, TA; (e) Clorofórmato de p-nitrofenilo, pindina, DCM, 0 °C a TA

Esquema 3: Síntesis de compuesto (**191**).

- 10 [0207] *Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-Fluoren-9-il)metilo (**187**):* Se añadieron diisopropiletilamina (1,54 ml, 8,83 mmol), HATU (2,24 g, 5,89 mmol) y (S)-2-amino-N-(4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)hexanamida (**161**) (2,19 g, 2,94 mmol) a una solución de
- 15 ((N-(9-fluorenilmetoxycarbonil)-L-valina (1 g, 2,94 mmol), en DMF (20 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de completarse el material de partida, la mezcla de reacción se inactivó con agua helada. El sólido precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar ((S)-1-(((S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de ((9H-fluoren-9-il)metilo (**187**; 2,5 g) como un sólido LCMS: MH⁺ 1067, tiempo de retención 2,42 min.
- 20

- [0208] *Síntesis de (S)-2-((S)-2-Amino-3-metilbutanamido)-N-(4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)hexanamida (**188**):* Se añadió una solución al 30 % de piperidina en DMF (4,5 ml) a una solución de ((S)-1-(((S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de ((9H-fluoren-9-il)metilo (**187**) (1,5 g, 1,40 mmol) en DMF (6 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de completar la reacción el material de partida, la mezcla de reacción se concentró en condiciones reducidas y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con EtOAc al 100 % para proporcionar (S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-N-(4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)hexanamida (**188**; 1,1 g) como un sólido. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10,07 (s, 1H), 7,64-7,63 (d, 4H), 7,56-7,54 (d, 2H), 7,46-7,35 (m, 9H), 7,27-7,24 (m, 8H), 7,185-7,11 (m, 2H), 7,05-7,03 (d, 2H), 4,71 (s, 2H), 4,44 (d, 1H), 3,25-3,16 (d, 1H), 3,01-3,00 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 1,98-1,93 (m, 2H), 1,68-1,38 (m, 4H), 1,15 (s, 10H), LCMS: MH⁺ 845, tiempo de retención 3,63 min.
- 25
- 30

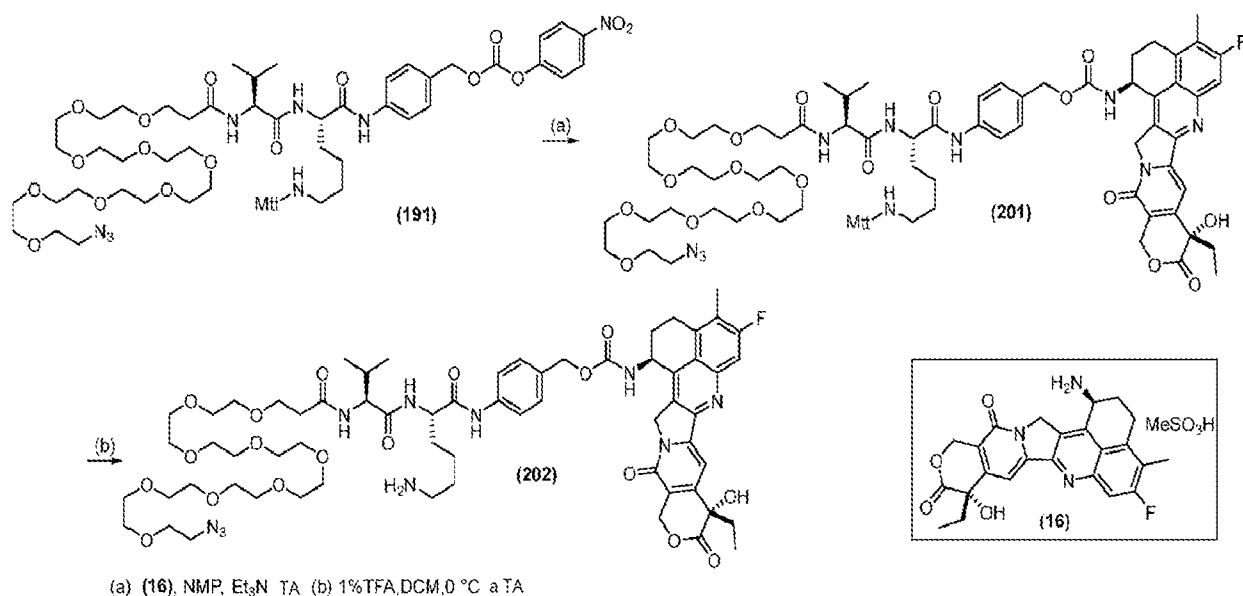
[0209] *Síntesis de 1-azido-N-((S)-1-(((S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (189)*: Se añadieron diisopropiletilamina (0,49 ml, 2,83 mmol), HATU (719,47 mg, 1,89 mmol) y (S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-N-(4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)hexanamida (188) (800 mg, 0,94 mmol) a una solución de ácido 1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-oico (86) (484 mg, 0,94 mmol) en DMF (8 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se inactivó con agua (15 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentraron en condiciones reducidas y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con MeOH al 3 % en DCM para proporcionar 1-azido-N-((S)-1-(((S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (189; 0,60 g) como una goma. RMN ¹H (400 MHz, DMSO- d₆): δ 9,91 (s, 1H), 8,02-8,00 (d, 2H), 7,95 (s, 2H), 7,87-7,85 (d, 1H), 7,64-7,63 (d, 4H), 7,57-7,55 (d, 2H), 7,46-7,32 (m, 11H), 7,26-7,24 (m, 8H), 7,15-7,11 (t, 2H), 7,05-7,03 (d, 2H), 4,71 (s, 2H), 4,35-4,33 (m, 1H), 4,19 (s, 1H), 3,59-3,36 (m, 38H), 2,68-2,38 (m, 6H), 2,22 (s, 3H), 1,98-1,92 (m, 2H), 1,47-1,17 (m, 4H), 1,02 (s, 9H), 0,85-0,80 (m, 6H). LCMS: MH⁺ 1338, tiempo de retención 2,92 min.

[0210] *Síntesis de 1-azido-N-((S)-1-(((S)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-((4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (190)*: Se añadió NH₄F (166 mg, 4,48 mmol) a una solución de 1-azido-N-((S)-1-(((S)-1-((4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)metil)fenil)amino)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (189) (600 mg, 0,44 mmol) en metanol (10 ml) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se diluyó con agua (15 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con MeOH al 5 % en DCM para proporcionar 1-azido-N-((S)-1-(((S)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-((4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (190; 0,40 g) en forma de goma. RMN ¹H (400 MHz, DMSO- d₆): δ 9,81 (s, 1H), 7,96-7,94 (d, 1H), 7,84-7,81 (d, 1H), 7,53-7,51 (d, 2H), 7,37-7,35 (d, 4H), 7,26-7,12 (m, 9H), 7,096-7,04 (d, 2H), 5,06-5,04 (t, 1H), 4,43-4,41 (d, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,18-4,16 (t, 1H), 3,60-3,46 (m, 33H), 3,39-3,36 (t, 2H), 2,50-2,23 (m, 2H), 2,23 (s, 3H), 2,23-1,93 (m, 2H), 1,48-1,23 (m, 6H), 0,85-0,80 (m, 6H). LCMS: MH⁺ 1100, tiempo de retención 3,72 min.

[0211] *Síntesis de (4-nitrofenil)carbonato de 4-((32S,35S)-1-azido-35-(4-((difenil(p-tolil)metil)amino)butil)-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido)bencilo (191)*: Se añadieron piridina (0,14 ml, 1,80 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (14) (145 mg, 0,72 mmol) a una solución de 1-azido-N-((S)-1-(((S)-6-((difenil(p-tolil)metil)amino)-1-((4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (190) (400 mg, 0,36 mmol) en DCM (10 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CCF. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con MeOH al 3 % en DCM para proporcionar 4-((32S,35S)-1-azido-35-(4-((difenil(p-tolil)metil)amino)butil)-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido)bencil (4-nitrofenil) carbonato (191; 0,34 g) como una goma. LCMS: MH⁺ 1265, tiempo de retención 1,33 min.

Síntesis de ((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)carbamato de 4-((32S,35S)-35-(4-aminobutil)-1-azido-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido)bencilo (202).

[0212]



Esquema 4: Síntesis de precursor de conjugado de enlazador escindible por proteasa-carga útil (202)

[0213] *Síntesis de ((1S, 9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)carbamato de 4-((32S,35S)-1-azido-35-(4-((difenil(p-tolil)metil)amino)butil)-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido) bencilo (201):* Se añadieron trietilamina (0,09 ml, 0,62 mmol) y (1R,9R)-1-amino-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-1,2,3,9,12,15-hexahidro-10H,13H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-10,13-diona metano sulfonato (mesilato de exatecán; 16; 131 mg, 0,25 mmol) a una solución de (4-nitrofenil) carbonato de 4-((32S,35S)-1-azido-35-(4-((difenil(p-tolil)metil)amino)butil)-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido) bencilo (191; 311 mg, 0,25 mmol) en NMP (2,5 ml) a 0 °C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 h. El progreso de la reacción se monitorizó mediante LCMS. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se inactivó con agua (15 ml) y se extrajo con metanol al 10 % en cloroformo (2 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. Se añadió éter dietílico al material en bruto y el precipitado resultante se filtró y purificó usando cromatografía en columna (Combi-Flash) eluyendo con MeOH al 5 % en DCM para proporcionar ((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)carbamato de 4-((32S,35S)-1-azido-35-(4-((difenil(p-tolil)metil)amino)butil)-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido)bencilo (201) como un sólido (0,3 g). LCMS: MH⁺ 1561, tiempo de retención 2,18 min.

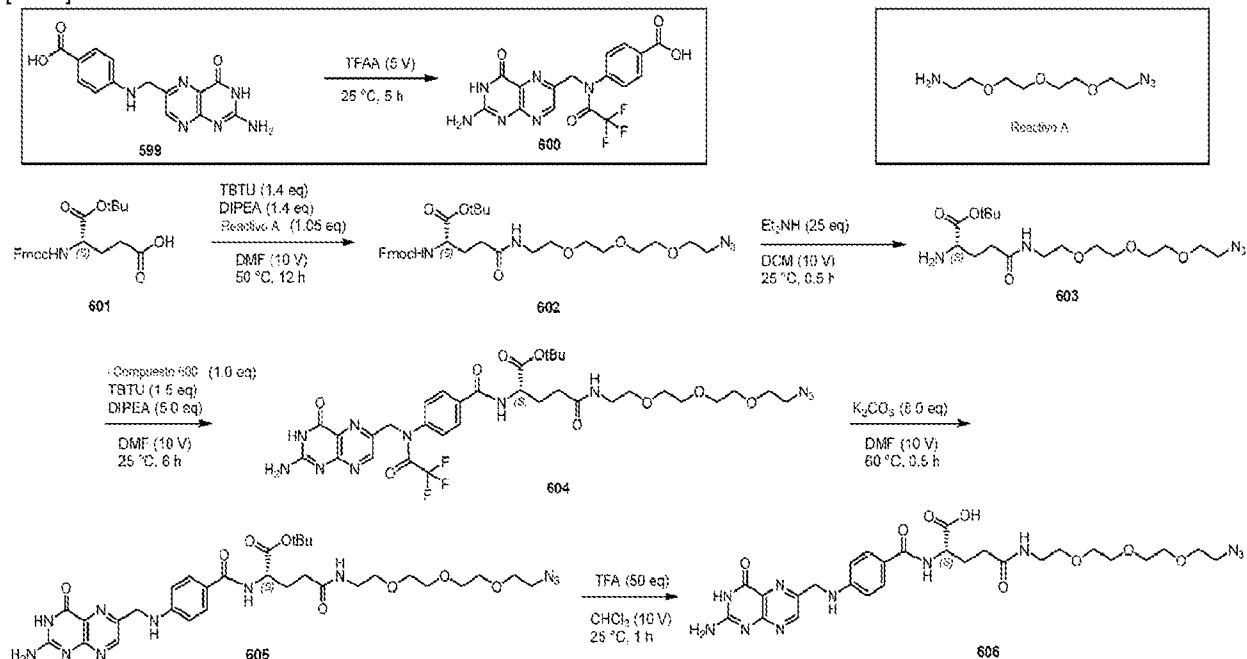
[0214] *Síntesis de ((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)carbamato de 4-((32S,35S)-35-(4-aminobutil)-1-azido-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido)bencilo (202):* Se añadió una solución al 1% de ácido trifluoroacético (TFA) en DCM a una solución de ((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)carbamato de 4-((32S,35S)-1-azido-35-(4-((difenil(p-tolil)metil)amino)butil)-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido)bencilo (201; 300 mg, 0,19 mmol) en DCM (5 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El progreso de la reacción se monitorizó mediante LCMS. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se trituró con éter dietílico y se purificó mediante RP-prep-HPLC para proporcionar ((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)carbamato de 4-((32S,35S)-35-(4-aminobutil)-1-azido-32-isopropil-30,33-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazahexatriacontan-36-amido)bencilo (202) (70 mg) como un sólido. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,96 (s, 1H), 8,12-8,10 (q, 2H), 7,89-7,87 (d, 1H), 7,76-7,61 (d, 1H), 7,59-7,31 (m, 7H), 6,51 (s, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,29 (s, 3H), 5,09 (s, 2H), 4,37-4,20 (m, 1H), 4,18-4,16 (t, 1H), 3,49-3,44 (m, 4H), 3,12-2,55 (m, 39H), 2,40-1,34 (m, 15H), 0,89-0,82 (m, 9H), LCMS: MH⁺ 1305, tiempo de retención 5,33 y 5,47 min.

Ejemplo 2: Síntesis de precursores de conjugados de ácido fólico

[0215] Los precursores de conjugado de ácido fólico adecuados para preparar un NDC que reconoce un receptor de folato descrito en el presente documento se pueden preparar según uno de los siguientes protocolos sintéticos. Como los precursores del conjugado de ácido fólico comprenden un grupo azida terminal, son adecuados para unirse a una nanopartícula funcionalizada con restos de alquino (por ejemplo, DBCO), utilizando química clic.

Síntesis de ácido (S)-16-(4-(((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-yl)metil)amino)benzamido)-1-azido-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-17-oico (606)

5 [0216]



10 [0217] Preparación del compuesto 600: Se disolvió el compuesto 599 (160 g, 512 mmol) en TFAA (800 ml) a 25 °C y se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno en la oscuridad durante 5 horas. A continuación, se eliminó el disolvente a 50 °C al vacío para dar el producto en bruto. El producto en bruto se trituró con MTBE (750 ml) durante 60 min y, a continuación, se filtró para proporcionar el compuesto 600 (203 gramos en bruto) como un sólido, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS: RMN ¹H: (400 MHz, CDCl₃) δ 12,74 (s ancho, 1H), 8,88 (s, 1H), 7,97-8,05 (m, 2H), 7,66-7,74 (m, 2H), 5,26 (s, 1H).

15 [0218] Preparación del compuesto 602: Se añadieron TBUTU (238 g, 740 mmol) y DIPEA (95,7 g, 740 mmol) a una solución del compuesto 601 (225 g, 529 mmol) en DMF (2,25 litros). Después de 30 minutos de agitación a 20 °C, se añadió 2-(2-(2-(2-azidoeto)eto)eto)etan-1-amina (Reactivo A; 121 g, 555 mmol) y la mezcla se agitó a 50 °C durante 12 horas. Se combinaron y procesaron dos mezclas de reacción, y el residuo se diluyó con H₂O (3 litros) y se extrajo con acetato de etilo (1500 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico (800 ml x 3), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida y se purificaron mediante cromatografía en columna (SiO₂, Éter de petróleo/acetato de etilo = 100/1 a 1/1) para proporcionar el compuesto 602 (590 g) en forma de un aceite. RMN ¹H: (400 MHz, CDCl₃) δ 7,76-7,78 (m, 2H), 7,63-7,60 (m, 2H), 7,41-7,27 (m, 4H), 6,43 (s, 1H), 5,70 (s, 1H), 4,42-4,38 (m, 2H), 4,24-4,23 (m, 2H), 3,63-3,36 (m, 16H), 2,28-2,18 (m, 3H), 1,98-1,96 (m, 1H), 1,48 (s, 9H).

25 [0219] Preparación del compuesto 603: Se añadió N-etiletanamina (1,27 kg, 17,4 mol) a una solución del compuesto 602 (435 g, 695 mmol) en DCM (4,35 litros) y la mezcla se agitó a 25 °C durante 3 horas. A continuación, se eliminó el disolvente a temperatura ambiente al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna (DCM/MeOH = 100/1 a 1/1) para proporcionar el compuesto 603 (245 g) en forma de un aceite. RMN ¹H: (400 MHz, CDCl₃) δ 6,55 (s, 1H), 3,67-3,30 (m, 17H), 2,34-2,30 (m, 2H), 2,10-2,06 (m, 1H), 1,87 (s, 2H), 1,77-1,73 (m, 1H), 1,44 (s, 9H).

35 [0220] Preparación del compuesto 604: Se añadieron TBUTU (119 g, 372 mmol) y DIEA (160 g, 1,24 mol) a una solución del compuesto 600 (101 g, 248 mmol) en DMF (900 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. A continuación, se añadió el compuesto 603 (100 g, 248 mmol) en DMF (100 ml). La mezcla se agitó a 25 °C durante 12 horas. Se combinaron dos mezclas de reacción y se concentraron y el residuo se diluyó con H₂O (2,5 litros) y se extrajo con acetato de etilo (1 litro x 5). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico (600 ml x 3), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto 4 (420 gramos en bruto) como un sólido, que se usó en la siguiente etapa sin más purificación adicional.

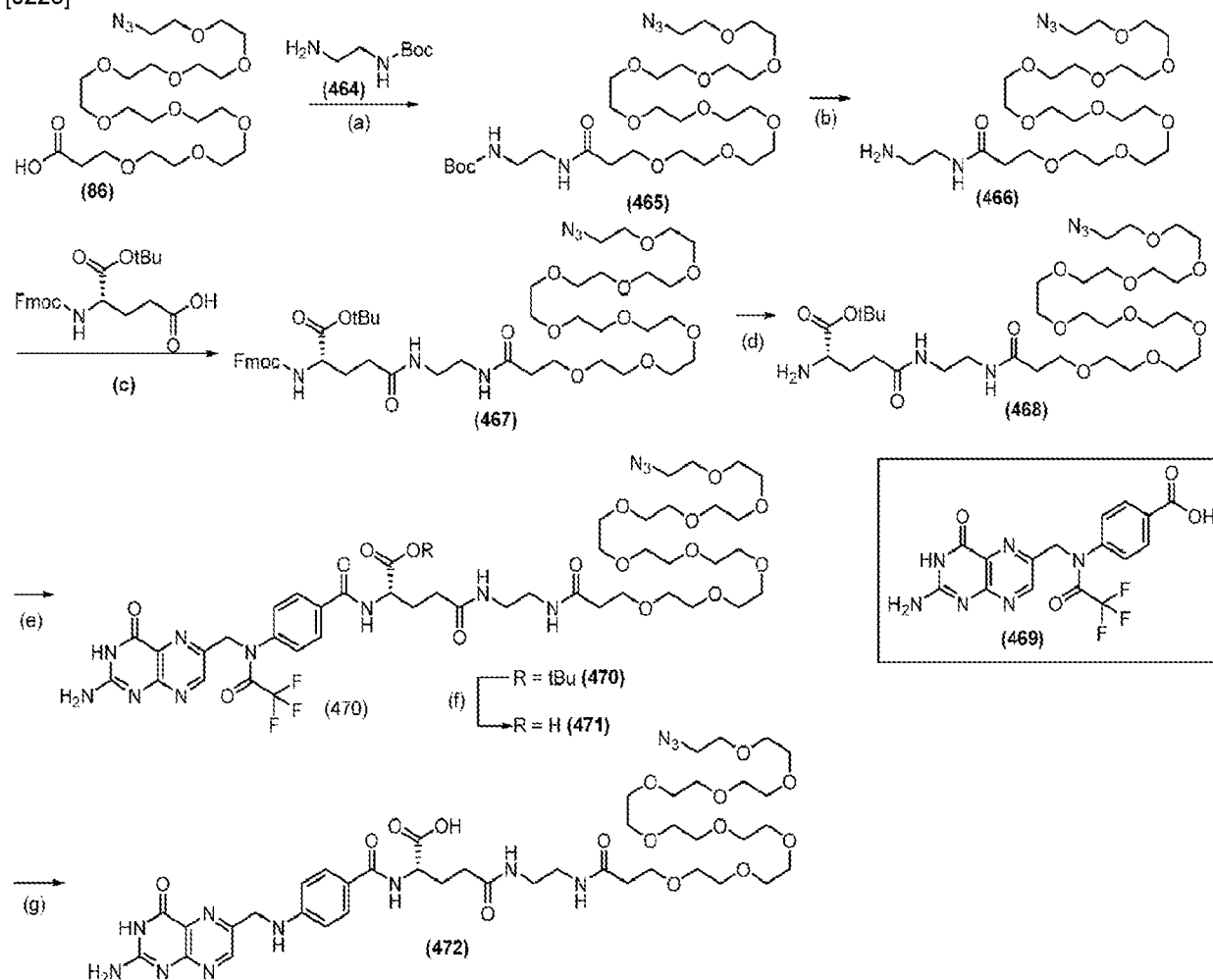
40 [0221] Preparación del compuesto 605: Se añadió K₂CO₃ (585 g, 4,23 mol) a una solución del compuesto 604 (420 g, 529 mmol) en THF (4,2 ml) y H₂O (500 ml) y la mezcla se agitó a 60 °C durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se

concentró a presión reducida para eliminar el THF y el residuo se diluyó con H₂O (500 ml) y se ajustó el pH a 3 con HCl (1), se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto 605 (260 gramos en bruto) como un sólido, que se usó directamente sin purificación.

[0222] Preparación del compuesto 606: Se añadió ácido trifluoroacético (2,12 kg, 18,6 mol) de una vez a una mezcla del compuesto 605 (260 g, 373 mmol) en CH₂Cl₂ (2,6 litros) a 20 °C en atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agitó a 20 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante HPLC (columna: Agela DuraShell C18 250 × 80 mm × 10 µm; fase móvil: [agua (NH₄HCO₃ 10 mM)-MeOH]; B %: 5 %-40 %, 20 minutos) para producir el compuesto 606 (52,5 g) en forma de un sólido. (M+H) 642,80; IR: 2107 (enlace N₃).

Síntesis de ácido (S)-38-(4-(((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)amino)benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oico (472)

[0223]



(a) EDC, HOBT, EA, DCM, TA (b) TFA, DCM, TA (c) PyBOP, DIPEA, DMF, TA (d) Piperidina, DMF, 0 °C a TA (e) 469, PyBOP, DIPEA, DMF, TA (f) TFA, DCM, RT, (g) Liq. NH₃, DMF, TA entonces RP-HPLC prep

Esquema 5: Síntesis de precursor de conjugado de ácido fólico (472)

[0224] Síntesis de (1-azido-30-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31-azatritriacontan-33-il)carbamato de terc-butilo (465): Se añadieron trietilamina (0,36 ml, 2,64 mmol), EDC (218 mg, 1,14 mmol), HOBT (154 mg, 1,14 mmol) y (2-aminoetil)carbamato de terc-butilo (464) (124 mg, 0,881 mmol) a una solución de ácido 1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-oico (86; 450 mg, 0,881 mmol), en DCM (20 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción fue monitorizado por CCF. Después del consumo del material de partida, la mezcla de reacción se extrajo con DCM y agua, y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida y se secó al vacío para proporcionar (1-azido-30-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31-azatritriacontan-33-il)carbamato de terc-butilo (465; 0,45 g) como líquido. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 7,83 (t, 1H), 6,75 (t, 1H), 3,61-3,31 (m, 38H), 3,02-2,97 (t, 4H), 2,28 (t, 2H), 1,37 (s, 9H).

[0225] *Síntesis de N-(2-aminoetil)-1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (466)*: Una solución de (1-azido-30-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31-azatritriacontan-33-il)carbamato de terc-butilo (**465**) (350 mg, 0,462 mmol) en DCM se enfrió a 0 °C y se le añadió TFA gota a gota, y a continuación la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción fue monitorizado por CCF. Después del consumo del material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se azeótropó con DCM (3 veces) para proporcionar el producto en bruto (**466**), que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con MeOH al 5 % en DCM para proporcionar N-(2-aminoetil)-1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (**466**; 0,25 g) en forma líquida. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8,02 (t, 1H), 7,73 (t, 2H), 3,71-3,26 (m, 40H), 2,86(t, 2H), 2,35(t, 2H).

[0226] *Síntesis de (S)-38-(((9H-fluoren-9il)metoxi)carbonil)amino)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (467)*: Se añadieron diisopropiletilamina (0,174 ml, 1,0 mmol), PyBOP (416 mg, 0,8 mmol) y N-(2-aminoetil)-1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacontan-30-amida (**466**) (331 mg, 0,6 mmol) a una solución de ácido (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (170 mg, 0,4 mmol), en DMF (5 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El progreso de la reacción fue monitorizado por CCF. Después del consumo del material de partida, la mezcla de reacción se evaporó al vacío a baja temperatura y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con MeOH al 5 % en DCM para proporcionar (S)-38-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (**467**; 0,35 g) como líquido. MH⁺ 962, tiempo de retención 1,81 min.

[0227] *Síntesis de (S)-38-amino-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (468)*: Se añadió una solución al 30 % de piperidina en DMF (1 ml) a una solución de (S)-38-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (**467**; 350 mg, 3,65 mmol) en DMF (5 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El progreso de la reacción fue monitorizado por CCF. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar (S)-38-amino-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (**468**; 250 mg), que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. MH⁺ 739, tiempo de retención 1,50 min.

[0228] *Síntesis de (S)-38-(4-(N-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamido)-benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (470)*: Se añadieron diisopropiletilamina (0,107 ml, 0,613 mmol), PyBOP (254 mg, 0,49 mmol) y (S)-38-amino-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (**468**) (271 mg, 0,368 mmol) a una solución de ácido 4-(N-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamido)benzoico (**469**; 100 mg, 0,245 mmol) en DMF (5 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El progreso de la reacción fue monitorizado por CCF. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se concentró al vacío a baja temperatura, a continuación se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con MeOH al 10 % en DCM para proporcionar (S)-38-(4-(N-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamido)benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (**470**; 180 mg) como un sólido. MH⁺ 1129, tiempo de retención 2,61 min.

[0229] *Síntesis de ácido (S)-38-(4-(N-((2-Amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamido)benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oico (471)*: Se añadió ácido trifluoroacético (0,123 ml, 1,59 mmol) a una solución de (S)-38-(4-(N-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamido)benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oato de terc-butilo (**470**) (180 mg, 0,16 mmol) en DCM a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El progreso de la reacción fue monitorizado por CCF. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se azeótropó con DCM (3 veces) para producir el producto en bruto (**471**; 100 mg), que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. MH⁺ 1073, tiempo de retención 2,34 min.

[0230] *Síntesis de ácido (S)-38-(4-(((2-Amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)amino)benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oico (472)*: Se añadió NH₃ acuoso (disuelto en DMF) (0,01 ml, 0,71 mmol) a una solución de ácido (S)-38-(4-(N-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)-2,2,2-trifluoroacetamido)benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oico (**471**; 80 mg, 0,071 mmol) en DMF (3 ml) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Después de completar la reacción del material de partida, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante RP-HPLC preparativa para proporcionar ácido (S)-38-(4-(((2-Amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil)amino)benzamido)-1-azido-30,35-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxa-31,34-diazanonatriacontan-39-oico (**472**; 15 mg) como un sólido. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8,62 (s, 1H), 8,01 (d, 1H), 7,98 (t, 1H), 7,64 (d, 2H), 6,64 (d, 2H), 4,47 (d, 2H), 4,21 (t, 1H), 3,68-3,35 (m, 38H), 3,07 (t, 4H), 2,32-2,11 (t, 6H), 1,86 (t, 1H). LCMS: MH⁺ 977, tiempo de retención 1,96 min.

[0231] *Procedimiento LCMS*: Columna YMC TRIART C18 (33 x 2,1 mm, 3u); (fase móvil: 95 % [0,1 % HCOOH en agua] y 5 % [0,1 % HCOOH en CH₃CN] mantenida durante 0,50 minutos y a continuación hasta 1 % [0,1 % HCOOH en agua] y 99 % [0,1 % HCOOH en CH₃CN] en 3,0 min, mantenida esta composición hasta 4,00 min y finalmente se vuelve a la condición inicial en 4,10 min, mantenida durante 4,50 min). Caudal: 1,0 ml/min.

Ejemplo 3: Síntesis de conjugados de fármacos y nanopartículas (NDC)

Preparación de Nanopartículas

[0232] Se puede utilizar la metodología de síntesis acuosa para la preparación y funcionalización de nanopartículas ultrapequeñas de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede utilizar una metodología basada en los procedimientos descritos en los documentos WO 2016/179260 A1 y WO 2018/213851 A1.

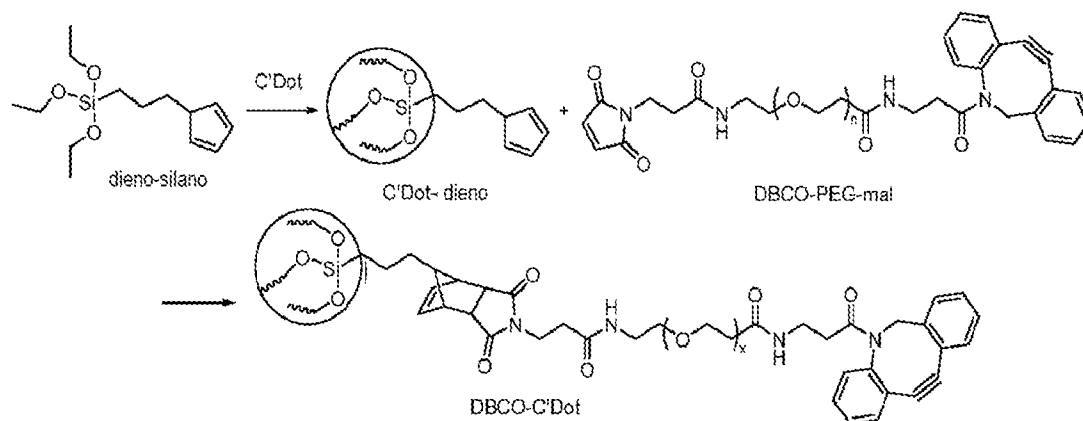
[0233] Por ejemplo, un compuesto fluorescente tal como, pero sin limitación, Cy5, puede funcionalizarse con un grupo maleimida, para proporcionar un compuesto fluorescente funcionalizado con maleimida que tenga una carga positiva neta. Este se puede conjugar con un tiol-silano, tal como (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS) para producir un compuesto fluorescente funcionalizado con silano, tal como Cy5-silano. La conjugación se puede realizar en dimetilsulfóxido (DMSO) en una caja de guantes bajo atmósfera inerte durante la noche (16-24 horas) y a temperatura ambiente (18-25 °C).

[0234] Al día siguiente, la siguiente etapa de la síntesis se puede realizar en una cámara adecuada, tal como un matraz de vidrio, recipiente o reactor, y puede implicar agitar agua desionizada con un pH de alrededor de 8,5-10,5 que puede conseguirse utilizando una solución acuosa de hidróxido de amonio de pH 7,5-8,5. A continuación, se puede añadir un precursor de sílice, tal como un ortosilicato de tetraalquilo, por ejemplo, ortosilicato de tetrametilo (TMOS), a la cámara de reacción con agitación vigorosa a temperatura ambiente, seguido de la adición inmediata del compuesto fluorescente funcionalizado con silano, por ejemplo, Cy5-silano. La reacción se puede dejar en agitación a temperatura ambiente durante la noche (1-48 horas) para proporcionar núcleos de sílice que encapsulan el compuesto fluorescente, por ejemplo, colorante Cy5.

[0235] Al día siguiente, se puede añadir un PEG-silano a la reacción con agitación a temperatura ambiente para recubrir el núcleo de sílice con moléculas de PEG, y la reacción se puede dejar en agitación durante 1-48 horas. A esta etapa se le puede seguir calentar entre 75 y 85 °C durante 1 a 48 horas. A continuación, la reacción se puede enfriar hasta temperatura ambiente y purificar (por ejemplo, incluyendo filtración estéril para eliminar los agregados formados como subproducto de la reacción y las bacterias, si hay alguna presente). A continuación, se puede realizar una funcionalización adicional de la nanopartícula.

Funcionalización de Nanopartículas

[0236] Una nanopartícula preparada usando un procedimiento descrito en el presente documento puede funcionalizarse adicionalmente, por ejemplo, usando un procedimiento descrito en las figuras 2 o 3, o en el Esquema 6 a continuación. Por ejemplo, se puede usar (3-ciclopentadienilpropil)triethoxisilano ("dieno-silano") para funcionalizar una nanopartícula (por ejemplo, C'Dot) con grupos ciclopentadieno, a continuación se puede hacer reaccionar DBCO-PEG-maleimida con la nanopartícula funcionalizada con dieno para proporcionar una nanopartícula funcionalizada con DBCO.



Esquema 6. Un procedimiento de ejemplo de funcionalización de una nanopartícula con DBCO

[0237] Por ejemplo, se diluyó Cy5-C'Dot (que puede prepararse usando un procedimiento descrito en el presente documento) con agua desionizada hasta una concentración deseada, típicamente entre 15 y 30 μM, en un matraz de fondo redondo con una barra agitadora. En primer lugar, se diluyó (3-ciclopentadienilpropil)triethoxisilano

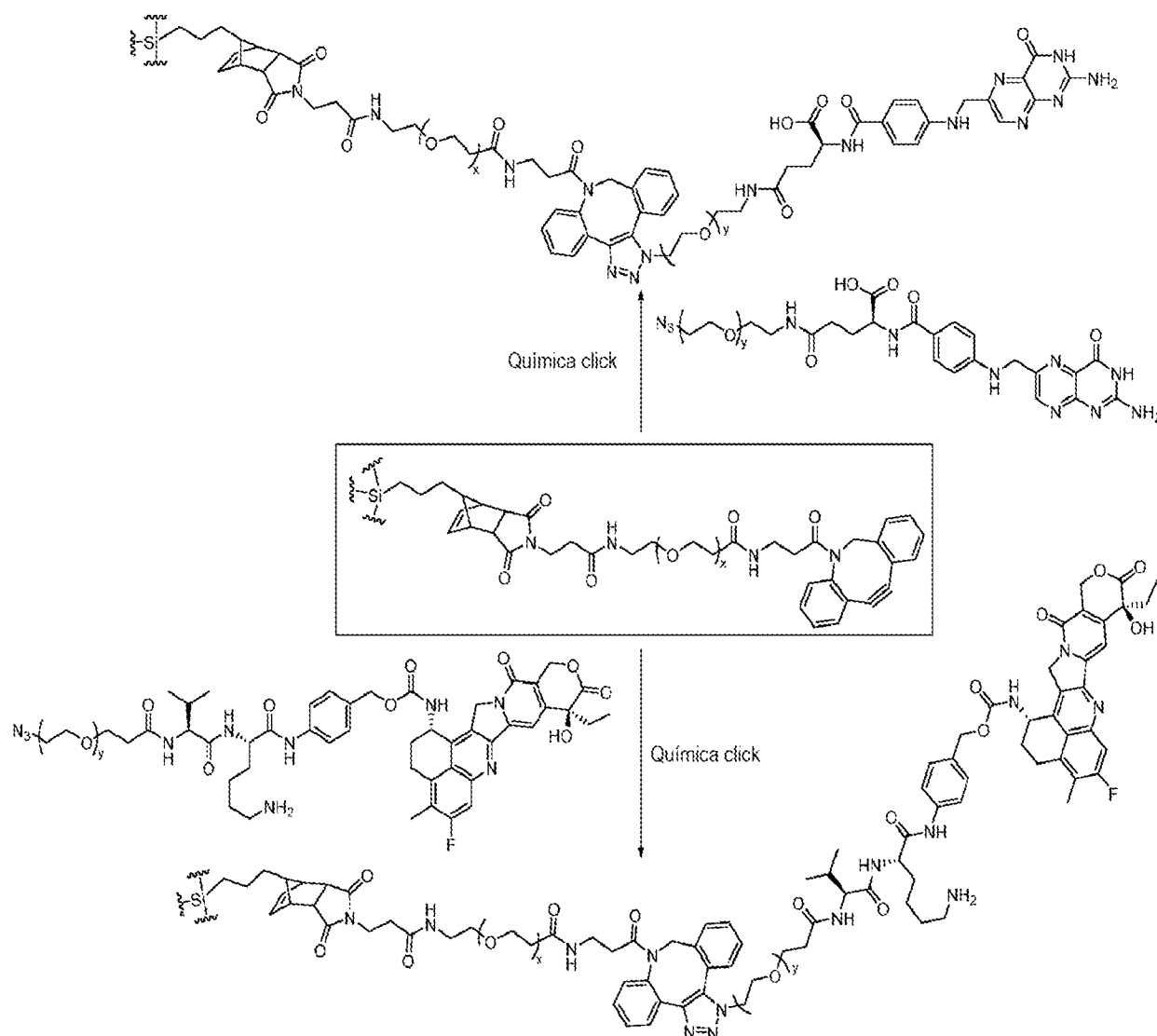
(ciclopentadieno) 100 veces en DMSO y, a continuación, se añadió a la reacción con agitación, para alcanzar la relación molar deseada de partícula con respecto a ciclopentadieno. Después de la reacción durante la noche, se añadió 10x PBS a la reacción para lograr una concentración final de 1x PBS. A continuación, se disolvió un precursor de DBCO-maleimida (por ejemplo, DBCO-PEG4-maleimida) en DMSO y se añadió a la reacción para alcanzar la

[0238] La purificación se puede realizar basándose en el principio de separación por tamaños. Los agregados y las moléculas pequeñas libres que tienen un peso molecular diferente al de las nanopartículas pegiladas se separan utilizando columnas de cromatografía de permeación en gel (GPC) o un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF). Se emplearon dos membranas diferentes, con tamaños de corte de 300 kDa y 50 kDa, para la eliminación de agregados grandes y moléculas pequeñas libres, respectivamente. Se pueden utilizar sistemas GPC y TFF para transferir el medio acuoso a agua, solución salina, etc. El DBCO-C'Dot purificado en agua desionizada se puede filtrar nuevamente de forma estéril y se pueden realizar las etapas de control de calidad (QC), seguidos del almacenamiento en el refrigerador a 2-8°C.

[0239] Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se cree que la carga neutra de los grupos ciclopentadieno evita la hidrólisis de los enlaces amida en el enlace, que puede acelerarse mediante otros tipos de precursores (por ejemplo, cuando se usan amina-silanos en lugar de los dienosilanos, los grupos amina primaria pueden provocar hidrólisis). Por lo tanto, los NDC producidos usando este procedimiento son altamente estables (ver, por ejemplo, la comparación en las figuras 33A-33B). Además, el uso de nanopartículas funcionalizadas con dieno (por ejemplo, nanopartículas funcionalizadas con ciclopentadieno) en la preparación de NDCS disminuye en gran medida la autocondensación del silano durante la reacción y mejora la estabilidad, la homogeneidad del tamaño, el rendimiento de la reacción y la pureza de las nanopartículas funcionalizadas. en relación con otros procedimientos (por ejemplo, utilizando amina-silanos).

Preparación de NDC dirigidos

[0240] Los NDC de la presente divulgación que comprenden la nanopartícula (también denominada C'Dot), el ligando dirigido (ácido fólico) y los conjugados de enlazador-fármaco se pueden preparar como se describe en el diagrama de flujo presentado en la figura 3, y en el Esquema 7 a continuación. Al ajustar la cantidad de precursor del ligando dirigido utilizado en la etapa de funcionalización, se puede lograr un número deseado de ligandos dirigidos por nanopartícula. Por ejemplo, las nanopartículas de la presente divulgación pueden funcionalizarse para contener de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 restos de ácido fólico, por ejemplo, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14 o aproximadamente 15 restos de ácido fólico. De manera similar, ajustando la cantidad de precursor de conjugado de carga útil-enlazador utilizado en la etapa de funcionalización, se puede lograr un número deseado de restos de carga útil por nanopartícula. Por ejemplo, las nanopartículas de la presente divulgación pueden funcionalizarse para contener de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 restos de exatecán-enlazador, por ejemplo, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24 o aproximadamente 25 restos de exatecán.



Esquema 7: Un procedimiento de ejemplo de funcionalización de una nanopartícula con restos de ácido fólico y restos de exatecán-enlazador

[0241] *Síntesis de nanopartícula conjugada de ácido fólico:* Se diluyó DBCO-C'Dot (denominado C'Dot en la Figura 3) usando agua desionizada hasta una concentración de 15-45 μM . Después de que la temperatura de la solución DBCO-C'Dot fuera de aproximadamente 18-25 $^{\circ}\text{C}$, se disolvió el precursor del ligando dirigido al receptor de folato (FR), tal como ácido fólico (FA) funcionalizado con una azida (compuesto 606 preparado en el Ejemplo 2) en DMSO (0,021 M) y, a continuación, se añadió a la reacción con agitación a temperatura ambiente, proporcionando un C'Dot funcionalizado con FA a través del grupo DBCO en la superficie. La relación de reacción entre DBCO-C'Dot y FA se mantuvo de 1:5 a 1:30 y la solución se agitó durante 16-24 horas a una temperatura de 18-25 $^{\circ}\text{C}$. La adición del ligando dirigido a FR va seguida de filtración estéril, purificación y pruebas de control de calidad para producir FA-C'Dot (denominado intermedio C'Dot en la Figura 3), y se puede almacenar en un refrigerador a 2-8 $^{\circ}\text{C}$. FA-C'Dot comprende una parte de grupos DBCO que están disponibles para reacciones de clic adicionales, por ejemplo, con moléculas con funcionalidad azida. Se entenderá que el ligando dirigido a folato (por ejemplo, ácido fólico) puede conjugarse con la nanopartícula después de la conjugación con, por ejemplo, un conjugado de carga útil-enlazador.

[0242] El volumen de la reacción de conjugación del ligando dirigido a FR puede oscilar entre 5 ml y 30 litros, y la concentración de DBCO-C'Dot puede oscilar entre 15 y 45 μM . Los siguientes parámetros se proporcionan para un volumen de reacción típico de 600 ml y una concentración de DBCO-C'Dot de 25 μM . La relación de DBCO-C'Dot con respecto a ligandos dirigidos a FR se controló con precisión para obtener el número deseado de ligandos dirigidos a FR por partícula, y normalmente puede oscilar entre 1:5 y 1:30. Para una relación típica de 1:12, se disolvió folato-PEG-azida en DMSO hasta una concentración de 0,021 M y se añadieron a la reacción 8,571 ml de la solución de folato-PEG-azida/DMSO. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se

purificó para obtener FA-C'Dot o se continuó directamente con el siguiente paso de conjugación si la pureza de FA-C'Dot no es inferior al 95 %. La tasa de conversión del ligando dirigido a FR suele ser superior al 95 %.

[0243] El número de grupos de ácido fólico unidos a cada FA-C'Dot se caracterizó mediante UV-Vis, y en la figura 4 se muestra un espectro de absorbancia UV-Vis representativo. El número de grupos DBCO en cada C'Dot se puede calcular utilizando el coeficiente de extinción de los grupos C'Dot y DBCO.

[0244] *Síntesis de NDC dirigido a FA (o FA-CDC) que comprende exatecán:* Se diluyeron FA-C'Dots usando agua desionizada hasta una concentración de 15-45 μ M. Después de que la temperatura de la solución de FA-C'Dot alcanzara aproximadamente 18-25 °C, se añadió el precursor del conjugado exatecán-enlazador (por ejemplo, compuesto 202 descrito en el Ejemplo 1) catepsina disuelta en DMSO (0,04 M) a la reacción con agitación a temperatura ambiente. Este paso funcionalizó el FA-C'Dot con el conjugado de enlazador-fármaco a través de los grupos DBCO disponibles en la superficie. La relación de reacción entre FA-C'Dot y el conjugado de enlazador-fármaco se mantuvo alrededor de 1:10-1:50 y la solución se agitó durante 16-24 horas. La adición del conjugado de enlazador-fármaco fue seguida por filtración estéril y purificación. FA-CDC (también denominado como NDC) en agua desionizada se somete a pruebas de control de calidad y se almacena en el refrigerador a 2-8 °C.

[0245] El volumen de la reacción de conjugación de exatecán escindible puede oscilar entre 5 ml y 30 l, y la concentración de FA-C'Dot puede oscilar entre 15 y 45 μ M. Los siguientes parámetros se proporcionan para un volumen de reacción típico de 600 ml y una concentración de FA-C'Dot de 25 μ M. La relación de FA-C'Dot con respecto a exatecán escindible se controló con precisión para obtener el número deseado de exatecán escindible por partícula, y normalmente puede oscilar entre 1:10 y 1:60. Para una relación típica de 1:40, se disolvió exatecán escindible en DMSO hasta una concentración de 0,04 M y se añadieron a la reacción 15 ml de la solución de exatecán escindible/DMSO. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se purificó para obtener FA-CDC.

[0246] El número de cargas útiles de exatecán unidas a cada NDC, por ejemplo, C'Dot conjugado con fármaco-enlazador funcionalizado con ácido fólico (FA) (FA-CDC), se puede caracterizar mediante UV-Vis. En la figura 5 se muestra un espectro de absorbancia UV-Vis representativo. El número de cargas útiles de exatecán en cada C'Dot se puede calcular utilizando el coeficiente de extinción de C'Dot y Exatecan a 360 nm después de restar la absorción de ácido fólico a la misma longitud de onda.

[0247] Tal como se indicó anteriormente, una nanopartícula se puede funcionalizar con un ligando dirigido al receptor de folato y un conjugado de carga útil-enlazador en cualquier orden (por ejemplo, el protocolo descrito anteriormente para funcionalizar la nanopartícula con exatecán se puede llevar a cabo antes del protocolo para conjugar ácido fólico).

[0248] *Determinación del tamaño de partícula:* El diámetro promedio de las NDC se puede medir mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como, pero sin limitarse a los mismos, espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) (figura 6) y cromatografía de permeación en gel (GPC) (figura 7).

[0249] FCS detecta la fluctuación de fluorescencia resultante de la difusión de partículas a través del punto focal en el objetivo. A continuación, la información de difusión de partículas se extrae de la autocorrelación de las fluctuaciones de intensidad de la señal, a partir de la cual se puede obtener el tamaño hidrodinámico promedio de las partículas ajustando la curva de autocorrelación utilizando una función de correlación FCS unimodal. El diámetro hidrodinámico promedio de NDC fue de aproximadamente 6 nm a aproximadamente 7 nm (figura 6).

[0250] GPC es un tipo de cromatografía de tamizado molecular, donde el mecanismo de separación se basa en el tamaño del analito (aquí NDC). El tiempo de elución de NDC se compara con una serie de proteínas con peso molecular variable. Los resultados sugieren que el tiempo de elución de los NDC es comparable con el de los patrones de proteínas con un peso molecular entre 158 kDa y 44 kDa, consistente con el tamaño hidrodinámico promedio del tamaño de partícula de aproximadamente 6,4 nm (figura 7).

[0251] *Análisis de pureza:* La pureza de los NDC se analizó usando HPLC de fase inversa (RP-HPLC). La RP-HPLC se acopla a un detector de matriz de fotodiodos, utilizando una columna Waters Xbridge Peptide BEH C18 disponible comercialmente. RP-HPLC separa moléculas con diferentes polaridades y es adecuado como procedimiento analítico para NDC debido a su tamaño de partícula ultrapequeño inferior a 10 nm. Utilizando RP-HPLC, las nanopartículas se separan bien de los agregados y otros restos químicos, tales como los ligandos dirigidos que están asociados de forma no covalente con las nanopartículas y los productos degradados. Se identifican diferentes restos químicos en función de su tiempo de elución y espectros UV/Vis únicos. El detector de matriz de fotodiodos recoge espectros UV-Vis de 210 a 800 nm y las impurezas de interés se miden a 330 nm. Un cromatograma representativo mostrado para los NDC en la figura 8, sugiere que la pureza de los NDC de la presente divulgación es superior al 99,0 %.

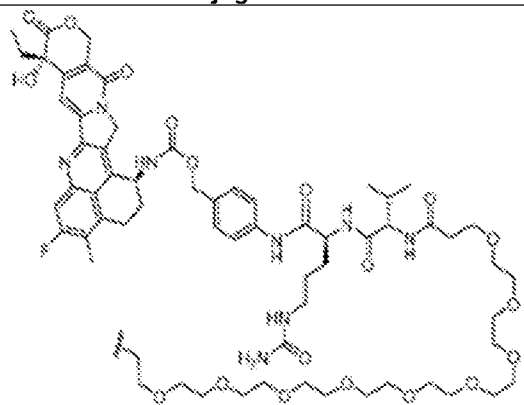
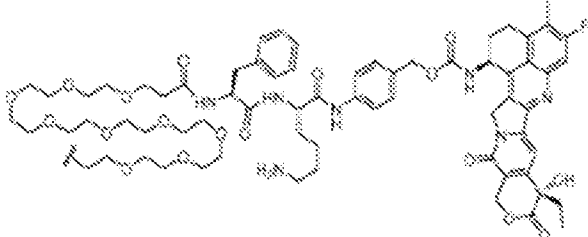
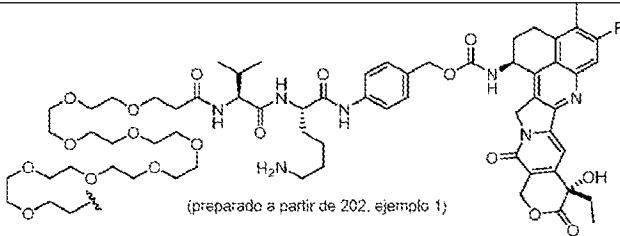
Ejemplo 4: Ensayos de liberación de fármacos

[0252] Los NDC de la presente divulgación comprenden un conjugado de enlazador-carga útil, por ejemplo, un enlazador escindible por proteasa, tal como un enlazador escindible por catepsina-B (Cat-B). Al entrar en contacto con

una proteasa, los NDC pueden liberar la carga útil (es decir, exatecán). El perfil de liberación de fármaco y la estabilidad de los conjugados de fármaco-enlazador en la nanopartícula se probaron de acuerdo con los siguientes protocolos.

5 [0253] Los NDC se prepararon usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3 y, a continuación, se incubaron en las condiciones de liberación deseadas para las pruebas de cinética de liberación. Los NDC analizados en el ensayo se proporcionan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: NDC de ejemplo utilizados en ensayos de liberación de fármacos.

NDC	Estructura del conjugado Exatecán-Enlazador
B	
C	
D	

10 [0254] El número de ligandos FA por partícula está entre 12 y 22; el número de conjugados de enlazador-fármaco por partícula está entre 17 y 25. Cada carga útil-enlazador se conjuga con el NDC a través de un resto de DBCO (preparado según el protocolo descrito en el Ejemplo 3).

15 [0255] El exatecán muestra un máximo de absorción a una longitud de onda de alrededor de 360 nm (figura 9), y esta señal se puede usar para rastrear las cargas útiles en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para estudios de liberación y estabilidad. La cantidad de fármacos liberados frente a los fármacos no liberados se midió usando HPLC de fase inversa analizando el área bajo la curva (AUC) (figura 10A y figura 10B).

20 [0256] **Procedimiento general:** Se usó una columna Waters Xbridge Peptide BEH C18 con dimensiones de 4,6 mm x 50 mm, un tamaño de partícula de 5 µm y un tamaño de poro de 300 Å (número de pieza 186003622). Se usó acetonitrilo (VWR HiPerSolv Chromanorm, grado UHPLC) tal como se recibió sin preparación adicional, se preparó ácido trifluoroacético al 0,01 % en agua desionizada añadiendo 1 ml de ácido trifluoroacético (grado HPLC, Millipore-Sigma) en 999 ml de agua desionizada de 18,2 MΩ·cm, que se generó utilizando un sistema de agua desionizada IQ7000 Millipore y pasó a través de un filtro de 0,2 µm antes de su uso. El lavado de sellado utilizado para el sistema

25 estuvo compuesto por 90 % de agua desionizada de 18,2 MΩ·cm y metanol al 10 % (grado HPLC, VWR). La aguja de inyección se lavó usando una mezcla de 25 % en volumen de agua desionizada de 18,2 MΩ·cm, 25 % en volumen de acetonitrilo, 25 % en volumen de metanol y 25 % en volumen de 2-propanol. Las muestras se prepararon en un intervalo de concentración de 0,25 a 2 µM y el volumen de inyección varía de 60 µL a 10 µL, respectivamente. Se puede utilizar una concentración de muestra más alta si la señal del detector es baja. Los viales utilizados para todas

30 las inyecciones son viales Fresh Waters Total Recovery con tapones de rosca que tienen septos de PTFE precortados (número de pieza 186000385C).

[0257] Antes de comenzar cualquier inyección de muestra, se encendió la lámpara PDA y se dejó calentar durante al menos 30 minutos. El sistema y la columna se equilibraron con TFA al 95 %, 0,01 % en agua desionizada y acetonitrilo al 5 % durante al menos 10 minutos a un caudal de 1,0 ml/min después de que la lámpara PDA se hubiera calentado. Antes de la inyección de cualquier muestra para análisis, se realizaron dos inyecciones en blanco, con volúmenes de inyección de 10 µl que contenían solo agua desionizada de 18,2 MΩ·cm. El gradiente utilizado comenzó con 95 % de TFA al 0,01 % en agua desionizada y 5 % de acetonitrilo y cambió linealmente a 15 % de TFA al 0,01 % en agua desionizada y 85 % de acetonitrilo durante 8 minutos. La composición de acetonitrilo se aumentó al 95 % durante un minuto adicional y se mantuvo al 95 % durante 2 minutos adicionales para garantizar que se eluyeran los compuestos fuertemente retenidos. A continuación, se volvió a cambiar la composición del disolvente a la composición inicial del gradiente durante un minuto adicional y se dejó equilibrar durante 3 minutos antes de que comenzara otra inyección. Entre las inyecciones de muestra se realizó una inyección en blanco para garantizar que no se produjera ningún arrastre.

[0258] Para un estudio típico de escisión por proteasa cathepsina B (Cat-B), primero se añadieron 2 µl, 0,33 µg/ µl de Cat-B (sigma Aldrich) con 300 µl de tampón de activación (MES 25 mM, DTT 5 mM, pH 5,0), formando 2,2 µg/ml de Cat-B. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de su uso. Después de la activación, se mezclaron 100 µl de conjugado de fármaco-nanopartícula 2 µM con 100 µl de Cat-B activada. A continuación, la mezcla se transfirió a 37 °C. Para controlar la cinética de escisión, en puntos de tiempo seleccionados posteriores a la incubación (por ejemplo, 2, 4, 24 h), se tomaron muestras de 10 µl de la mezcla y se inyectaron en HPLC (TFA/acetonitrilo). Para el análisis de los datos de escisión, se utilizó la integración de Empower 3 ApexTrack para determinar las áreas de pico para todos los componentes relevantes.

[0259] La cromatografía RP-HPLC de tres NDC representativos (NDC B, NDC C y NDC D) en diferentes puntos temporales después de la incubación con cathepsina-B se representa en las figuras 11A-11C, respectivamente. El tiempo para que se libere la mitad de las cargas útiles de cada NDC, es decir, $T_{1/2}$, bajo la condición experimental específica, se analizó mediante ajuste y se representa en las figuras 12A-12C respectivamente. La figura 12A representa el $T_{1/2}$ como 2,9 horas para NDC B. La figura 12B representa la $T_{1/2}$ como 2,6 horas para NDC C. La figura 12C representa el $T_{1/2}$ como 1,4 horas para NDC D.

[0260] *Prueba de estabilidad:* Para evaluar el perfil de liberación del fármaco y la estabilidad de los conjugados de enlazador-fármaco en condiciones sin escisión, se incubó un NDC de ejemplo en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o suero animal a 37 °C. El NDC se preparó según el Ejemplo 3 usando el precursor de conjugado exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1).

[0261] Para una prueba de estabilidad típica en tampón PBS, se prepararon 600 µl de mezcla de PBS (la concentración de conjugado de fármaco-nanopartícula se mantuvo en 2 µM, mientras que el porcentaje en volumen de PBS se mantuvo en 50 %) y se mantuvo a 37 °C. Para monitorizar la estabilidad de los conjugados de enlazador-fármaco unidos a las nanopartículas, en puntos de tiempo seleccionados posteriores a la incubación (por ejemplo, 4, 24, 48 y 72 h), se tomaron muestras de 10 µl de la mezcla y se inyectaron en HPLC (TFA/acetonitrilo). Para el análisis de los datos de escisión, se utiliza la integración de Empower 3 ApexTrack para determinar las áreas de pico para todos los componentes relevantes.

[0262] Para una prueba de estabilidad típica en plasma de especies variadas (por ejemplo, ratón, rata, perro, mono y humano), se prepararon 600 µl de mezcla de plasma (la concentración del conjugado de fármaco-nanopartícula se mantuvo en 2 µM, mientras que el porcentaje en volumen de plasma se mantuvo al 62,5 %) y se mantuvo a 37 °C. Para monitorizar la estabilidad de los conjugados de enlazador-fármaco, en puntos de tiempo seleccionados posteriores a la incubación (por ejemplo, 4, 24, 48 y 72 horas), primero se mezclaron 80 µl de la mezcla con 80 µl de acetonitrilo frío y, a continuación, se pasaron durante 30 minutos de centrifugación a 10.000 rpm. Después de eliminar las proteínas, se tomaron muestras cuidadosamente de 60 µl de sobrenadante y se inyectaron en HPLC. Para los NDC escindibles por cathepsina B, se utilizó TFA/acetonitrilo. Para el análisis de los datos de estabilidad, se utilizó la integración de Empower 3 ApexTrack para determinar las áreas de pico para todos los componentes relevantes.

[0263] El conjugado de enlazador-carga útil del NDC (tal como se preparó en el Ejemplo 3 usando el precursor del conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1) es estable, ya que se liberó un 5 % o menos del exatecán del conjugado de fármaco y enlazador después de 24 horas en condiciones sin escisión, es decir, cuando se mantienen en PBS, suero humano o suero de ratón.

Ejemplo 5: Estudio de unión celular por citometría de flujo *in vitro*

[0264] La actividad de unión celular de los NDC descritos en el presente documento se analizó según los siguientes protocolos. Los NDC utilizados se prepararon según el Ejemplo 3, utilizando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1. La cantidad de ácido fólico por nanopartícula y la cantidad de exatecán por nanopartícula se pudieron ajustar según el protocolo descrito en el Ejemplo 3.

[0265] *Células y cultivo celular*: La línea celular KB humana, las células SKOV-3 y la línea celular TOV-1 12 se adquirieron de ATCC. I-GROV1, la línea celular de carcinoma de ovario humano se adquirió de Merck Millipore. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 sin ácido fólico/10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina, a menos que se especifique lo contrario. Las células cancerosas se cultivaron en medio libre de ácido fólico (RPMI1640, ThermoFisher, GIBCO) durante al menos una semana antes del estudio. Los estudios de unión celular se realizaron incubando 5×10^5 células (un total de 500 μ L, 1 millón/ml) en PBS frío (con 1 % de BSA) con FA-CDC preparado en el Ejemplo 3 (concentración: 1 nM) durante 60 min a 4 °C (n=3). Después de esto, la suspensión celular se tiñó con el kit de viabilidad (Fixable Violet Dead Cell Stain Kit LIVE/DEAD™, Thermo Fisher) durante 10-15 min. A continuación, las células se centrifugaron (2000 rpm, 5 min), se lavaron (2-3 veces) usando PBS frío (con 1 % de BSA) antes de resuspenderlas en PBS (con 1 % de BSA). Se analizaron muestras por triplicado en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences) (canal Cy5, 633 nm/647 nm, tinción de células vivas/muertas, 405 nm). Los resultados se procesaron utilizando el software FlowJo y Prism 7 (GraphPad).

[0266] El estudio de unión competitiva (figura 13) se realizó usando el NDC del Ejemplo 3. El reconocimiento activo de NDC se puede bloquear completamente incubando con la presencia de ácido fólico libre 1 mM.

[0267] El estudio de unión competitiva muestra una mejora >40 veces en la capacidad de unión del NDC en comparación con el ácido fólico libre, lo que demuestra la presencia de un efecto multivalente al conjugar múltiples ligandos de ácido fólico en cada C'Dot ultrapequeño (figura 13).

[0268] Estos resultados demuestran las ventajas de conjugar múltiples ligandos pequeños que se dirigen a tumores en la superficie de la nanopartícula (C'Dots) para mejorar la capacidad de reconocimiento utilizando el efecto multivalente. El reconocimiento del receptor de folato puede bloquearse mediante la unión competitiva del ácido fólico libre, tal como incubando con la presencia de ácido fólico libre 1 mM.

[0269] La citometría de flujo muestra una eficacia comparable del reconocimiento receptor de folato de dos formulaciones de NDC con densidad de ligando de ácido fólico variada en la línea celular KB. El precursor del conjugado de enlazador-exatecán usado para preparar los NDC en este estudio se describe en el Ejemplo 1 (Compuesto 202). El grupo bloqueador tiene 1 mM de ácido fólico libre. (**FIGURA 14**).

[0270] Los resultados demostraron un aumento drástico (>300 veces de MFI) en el reconocimiento activo del receptor alfa de folato cuando la densidad del ligando de ácido fólico se incrementó de cero a 12 (es decir, 12 moléculas de ácido fólico por nanopartícula), mientras que se observó poca diferencia al aumentar aún más esa densidad hasta 25 moléculas de ácido fólico por nanopartícula.

[0271] La citometría de flujo muestra una eficacia comparable del reconocimiento del receptor de folato de tres NDC en la línea celular KB con una relación de fármaco con respecto a partícula (DPR) variada (es decir, número de moléculas de exatecán por nanopartícula). El grupo bloqueador implicó el bloqueo de receptores con 1 mM de ácido fólico libre. Los NDC con diferentes proporciones de exatecán por nanopartícula se prepararon usando el Compuesto 202 descrito en el Ejemplo 1, y los resultados del estudio se proporcionan en la **figura 15**. Todos los FA-CDC comprenden entre 12 y 22 restos de ácido fólico. Los FA-CDC con una alta relación fármaco-partícula (DPR) comprenden entre 35 y 50 grupos conjugados de exatecán-enlazador. Los FA-CDC con una DPR media comprenden entre 17 y 25 grupos conjugados de exatecán-enlazador. Los FA-CDC con una DPR baja tienen entre 5 y 10 grupos conjugados de exatecán-enlazador.

[0272] Estos resultados, junto con los cambios de tamaño de FCS casi sin cambios de los tres NDC, demuestran la sólida química de la superficie y la capacidad mantenida de reconocimiento del receptor de folato de los NDC descritos en el presente documento, que sorprendentemente no se ve perturbada por la alteración de la capacidad de carga de la carga útil y demuestra una ventaja significativa de los NDC aquí divulgados sobre otras plataformas de administración de medicamentos.

[0273] La preincubación de NDC en plasma humano no afectó negativamente a la capacidad de reconocimiento del receptor de folato. Este estudio fue diseñado para probar el posible impacto negativo del plasma humano en los NDC, tales como la formación de corona proteica. La formación de corona proteica y su impacto negativo en la capacidad de reconocimiento activo diseñado del sistema de administración de fármacos ha sido bien documentada en la literatura. Los resultados de este estudio de citometría de flujo se representan en la figura 16, que muestra la eficacia de los NDC dirigidos al receptor de folato casi sin cambios a 1 nM, después de una preincubación con cantidades variadas de plasma humano durante 24 horas. Los NDC se prepararon según el procedimiento del Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado de exatecán-carga útil del Ejemplo 1 (Compuesto 202). El grupo de bloqueo implicó el bloqueo con 1 mM de ácido fólico libre. Este estudio demostró claramente que la formación de una corona proteica (si la hubiera) en el NDC casi no tuvo ningún impacto negativo en la capacidad de reconocimiento *in vitro* de los NDC.

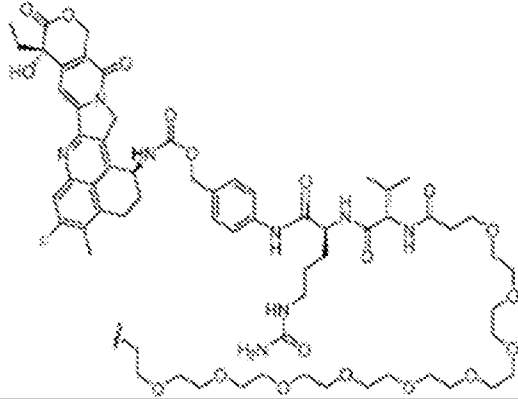
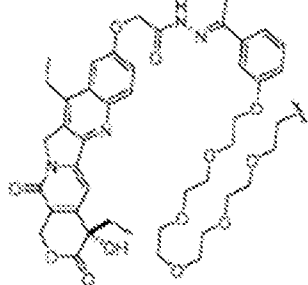
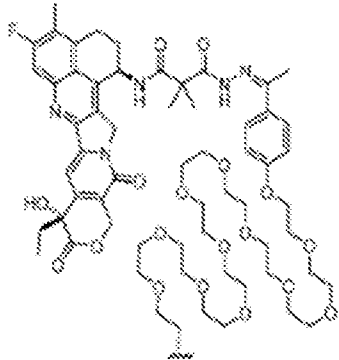
Ejemplo 6: Ensayo de viabilidad celular *in vitro*:

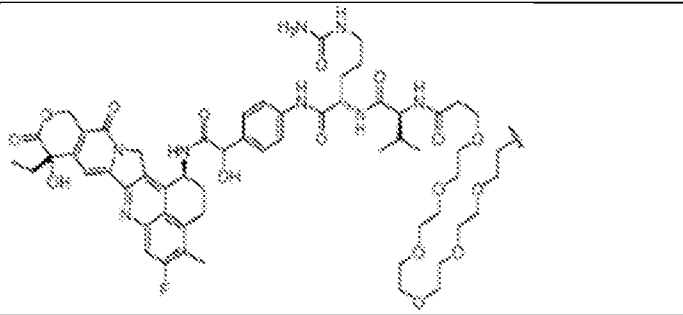
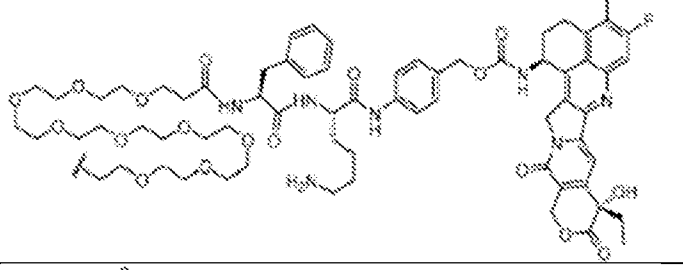
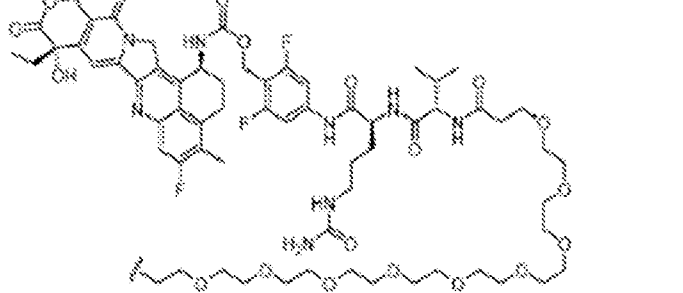
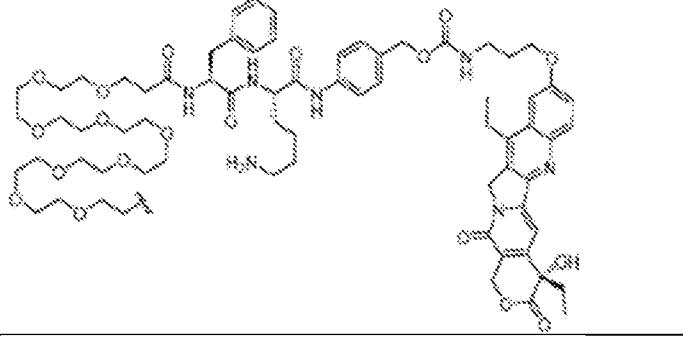
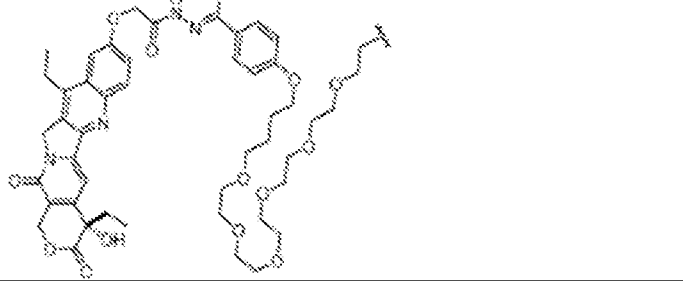
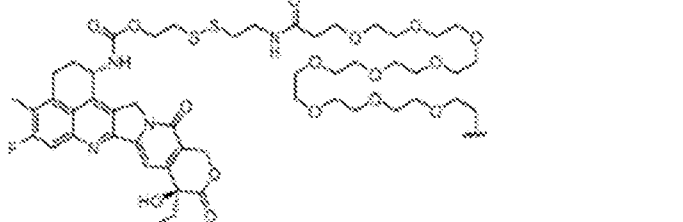
[0274] La citotoxicidad *in vitro* de los NDC descritos en el presente documento se probó en células cancerosas. Las células cancerosas se cultivaron en medio libre de ácido fólico (RPMI1640, ThermoFisher, GIBCO) durante al menos

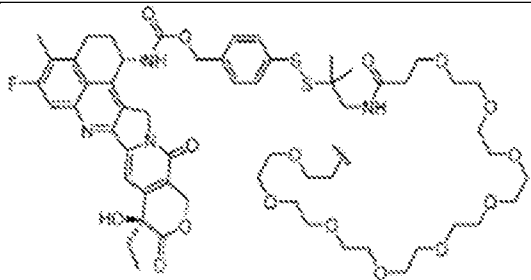
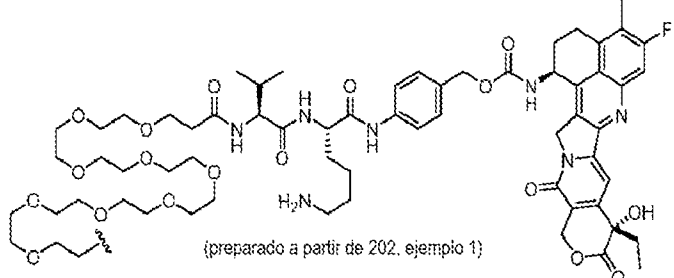
una semana antes del estudio. Las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^3 células por pocillo (un total de 90 ml) y se dejaron unir durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con NDC (preparado según el Ejemplo 3) en un intervalo de concentración de 0-50 nM (0, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 nM) mediante la adición de 10 ml de 10 x solución madre de FA-CDC.

[0275] Las células se trataron durante un tiempo de exposición predefinido (dependiendo del diseño del estudio, por ejemplo, 4-6 horas o 7 días). En el caso del estudio de viabilidad con un tiempo de exposición corto, las células cancerosas de cada pocillo se lavaron con 100 ml de PBS y se renovaron con 100 ml de medio celular. Después del lavado, las placas se devolvieron a la incubadora a 37 °C durante 7 días antes del ensayo de viabilidad. En el caso del estudio de viabilidad del tiempo de exposición de 7 días, no se realizó ninguna etapa de lavado adicional. Después de 7 días, se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo CellTiter-Glo2.0 (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los datos de viabilidad y proliferación se representaron utilizando el software Prism7 (GraphPad). En la Tabla 3 se presentan resultados representativos de viabilidad celular de seis FA-CDC con densidad superficial similar de ligandos dirigidos de ácido fólico y enlazadores de fármacos.

Tabla 3. Resultados representativos de viabilidad celular de NDC con densidad superficial similar de ligandos dirigidos de ácido fólico y conjugados de fármaco-enlazador.

Conjugado Carga útil-enlazador	IC ₅₀ en línea celular KB (nM)	IC ₅₀ en línea celular SKOV-3 (nM)
	0,2-5,2	10,7
	0,5-1,0	17,9
	0,7-7,2	n.t.

	17,5	n.t.
	0,2-22	0,4
	5,2	n.t.
	72,2	n.t.
	42,7	n.t.
	0,6	0,9

	49,4	n.t.
 (preparado a partir de 202, ejemplo 1)	0,3	0,13

[0276] El número de ligandos FA por partícula está entre 12 y 22; el número de conjugados enlazador-fármaco por partícula está entre 17 y 25. Cada carga útil-enlazador se conjuga con el NDC a través de un resto de DBCO (preparado según el protocolo descrito en el Ejemplo 3).

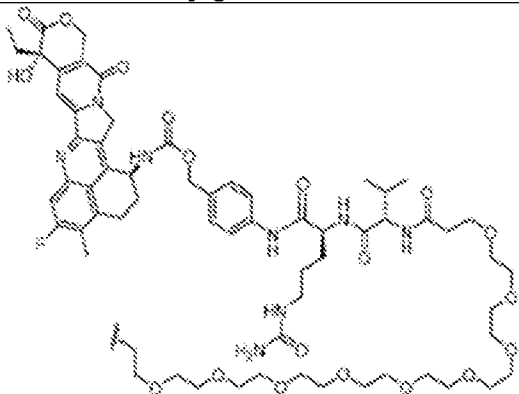
Ejemplo 7: Obtención de imágenes confocales bidimensionales (2D) de NDC en células cancerosas

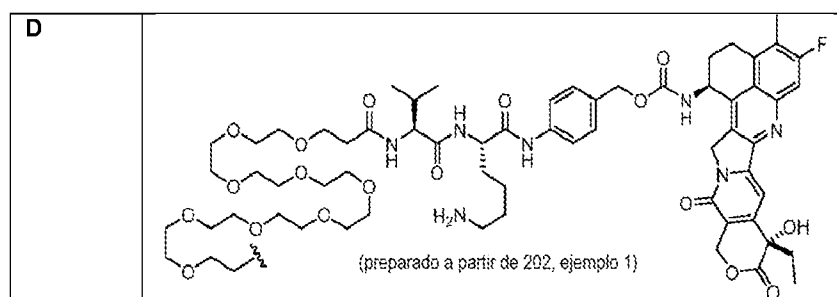
[0277] Se llevó a cabo un estudio de obtención de imágenes confocales 2D para determinar el reconocimiento de células con niveles variables de disponibilidad de receptores de folato, utilizando dos NDC de ejemplo. Las células con alta expresión de receptores de folato (indicadas como +++) eran células KB. Las células sin expresión de FR (indicadas como -) eran la línea celular TOV-112D. También se usaron células bloqueadas con FR.

[0278] Se mantuvieron células KB en medio RPMI 1640 libre de ácido fólico con 10 % de FBS, 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células TOV-112D se mantuvieron en una mezcla 1:1 de medio MCDB 105 que contenía una concentración final de 1,5 g/l de bicarbonato de sodio y medio 199 que contenía una concentración final de 2,2 g/l de bicarbonato de sodio, suplementado con 15 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células se tripsinizaron y se sembraron en un cubreobjetos con cámara Lab-Tek de 8 pocillos, a $1,0 \times 10^5$ células por pocillo, y se cultivaron durante la noche para permitir la unión.

[0279] Los NDC se prepararon según el Ejemplo 3 y se muestran a continuación en la Tabla 4. El NDC D se preparó usando el conjugado enlazador-carga útil (202) descrito en el Ejemplo 1.

Tabla 4. NDC de ejemplo utilizados en el ensayo de imágenes confocales 2D.

NDC	Conjugado de exatecán-enlazador
B	



[0280] Antes de la incubación con NDC, las células se lavaron una vez con medio RPMI 1640 libre de ácido fólico. El NDC se añadió a medio RPMI 1640 sin ácido fólico hasta una concentración final de 50 nM. Para las condiciones de bloqueo, se añadió ácido fólico (solución madre 20 mM disuelta en NaOH 0,1 M) hasta una concentración final de 0,1 mM y se incubó conjuntamente con NDC. Las células se incubaron con NDC a 37 °C durante 1 hora o 24 horas. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces. Para teñir los lisosomas, se añadió LysoTracker Green DND-26 (Thermo Fisher Cat. L7526, ex/em 504/511 nm) hasta una concentración final de 100 nM en medio RPMI 1640 sin ácido fólico con 10 % de FBS, 1 % de P/S y se incubaron a 37 °C durante 45 min. Las células se lavaron una vez para eliminar los colorantes lysotracker restantes. Para teñir los núcleos, se diluyó una solución Hoechst 33342 (Thermo Fisher Cat. 62249, 20 mM) 1:4000 en medio RPMI 1640 sin ácido fólico con 10 % de FBS, 1 % de P/S y se incubó a 37 °C durante 10 min. Las células se lavaron una vez y el medio se intercambió por medio RPMI 1640 sin rojo fenol para obtener imágenes confocales utilizando un microscopio confocal de disco giratorio Nikon, objetivo de 60x, líneas láser de 405 nm, 488 nm, 640 nm, tiempo de exposición de 100 ms para el canal 405, 500 ms para el canal 488 y 600 ms para el canal 640.

[0281] Los resultados de la obtención de imágenes con microscopio confocal de NDC en líneas celulares KB (++++ y TOV-1 12D(-) en el punto de tiempo de 1 hora mostraron que los NDC estaban presentes principalmente en la membrana celular de las células KB, que expresan un alto nivel de receptores de folato, pero no en condiciones de bloqueo o en la línea celular TOV-112D negativa para folato, lo que sugiere una unión específica de NDC a los receptores de folato. Después de 24 horas, los NDC unidos a la membrana se internalizaron y la cantidad de NDC internalizada aumentó significativamente en comparación con el punto de tiempo de 1 hora. Los NDC internalizados se localizaron en orgánulos ácidos teñidos con LysoTracker, lo que indica que el tráfico de NDC se produjo a través de la vía endolisosomal. El efecto del suero sobre la capacidad de unión de los NDC también se investigó preincubando los NDC en medios suplementados con FBS al 10 % durante la noche, antes de incubarlos con células, y no se observó ninguna diferencia significativa (datos no mostrados), lo que sugiere que la presencia del suero no tuvo ningún impacto en la capacidad de unión de los NDC.

[0282] Estos resultados de microscopía confocal de NDC B se proporcionan en la figura 17, y los resultados para NDC D se proporcionan en la figura 32. Estas imágenes demostraron el reconocimiento activo altamente específico y el tráfico de lisosomas de los NDC de la presente divulgación, lo que indica que una vez que los NDC dirigidos a FA se unen a las células, se internalizan en líneas celulares positivas para receptores de folato, donde se puede escindir la carga útil de exatecán (por ejemplo, por cathepsina-B) para liberar exatecán libre en la célula cancerosa.

Ejemplo 8: Obtención de imágenes confocales de FA-CDC en un modelo de esferoide tumoral 3D en células KB

[0283] Se realizó un ensayo de modelo de esferoide tumoral 3D para determinar la penetración tumoral de los NDC descritos en el presente documento. El ensayo comparó un NDC de ejemplo (preparado de acuerdo con el Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1), con una nanopartícula dirigida a FA sin carga útil (también preparada de acuerdo con el Ejemplo 3, con solo el precursor de FA y sin precursor de conjugado exatecán-carga útil); un ADC dirigido al receptor de folato (FR); y el correspondiente anticuerpo dirigido a FR sin carga útil. El anticuerpo dirigido a FR se preparó basándose en la secuencia publicada de mirvetuximab (proporcionada en la patente de Estados Unidos n.º 9,637,547 como huMov19). El ADC se preparó con el mismo anticuerpo y se conjugó con el fármaco maitansinoide DM4 (creado por Syngene International Ltd.) mediante un enlazador de ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfo-butírico (sSPDB) (basado en el enlazador utilizado en la patente de Estados Unidos n.º 9,637,547). El ADC y el anticuerpo se conjugaron cada uno con colorante orgánico Cy5, mediante reacción con éster Cy5-NHS, y se purificaron mediante una columna PD-10.

[0284] Se utilizaron microplacas esferoides de 96 pocillos con superficie de unión ultrabaja Corning para sembrar células KB para tener esferoides de KB con una densidad celular de 10.000/pocillo. Se generaron suspensiones unicelulares a partir de monocapas tripsinizadas y se diluyeron a 100.000 células/ml usando medio RPMI (sin ácido fólico). Se dispensaron 100 µl de suspensión celular en cada pocillo de una microplaca. La placa se mantuvo en una incubadora durante 24 horas para que las células formaran esferoides. Los esferoides de células KB se pueden observar fácilmente con un microscopio con un objetivo de 10X.

[0285] Se formaron esferoides de KB 3D después de cultivar durante la noche en microplacas de 96 pocillos ultrabajas. Se añadieron NDC (preparado según el Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1), nanopartículas dirigidas a folato ("FA-C'Dot"), ADC dirigido a FR o anticuerpo dirigido a FR sin carga útil en pocillos ($n = 3$) con una concentración final de 50 nM y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Cada esferoide de KB tratado y el esferoide de control se lavaron con PBS tres veces y, a continuación, se transfirieron cuidadosamente a una placa de 96 pocillos con fondo de vidrio (Cellvis) para su observación con un microscopio confocal Nikon A1R-STED, utilizando una línea láser de 640 nm, objetivo de 20 X. Los apilamientos en Z se adquirieron tomando imágenes bidimensionales, cada una separada por 1 μ m en la dirección Z.

[0286] En la figura 18 se muestran los resultados de las imágenes de microscopio confocal en apilamiento en Z de un esferoide de tumor KB tratado con NDC, FA-C'Dot, ADC dirigido a FR y anticuerpo dirigido a FR sin carga útil. Los resultados muestran la penetración y la buena difusión de NDC y FA-C'Dots en todo >800 nm de esferoides tumorales. Por el contrario, el anticuerpo marcado y el ADC simplemente se acumularon alrededor de los esferoides tumorales, pero no dentro de ellos. La capacidad de los NDC descritos en el presente documento para lograr una penetración tumoral eficiente es muy ventajosa y muestra una mejora significativa en comparación con las plataformas de administración de fármacos convencionales.

Ejemplo 9: Radiomarcaje con ^{89}Zr de DFO-FA-CDC y estudios de biodistribución y PET/CT estática *in vivo*

[0287] Se realizó un ensayo de radiomarcaje para determinar la biodistribución *in vivo* de los NDC dirigidos al receptor de folato de la presente divulgación. Los NDC utilizados para el ensayo se conjugaron con el quelante deferrioxamina (DFO) y a continuación se unieron con un radionucleido (^{89}Zr).

[0288] Para un marcaje típico de ^{89}Zr , se mezcló aproximadamente 1 nmol de NDC conjugado con DFO con 1 mCi de ^{89}Zr -oxalato (producido y proporcionado por el grupo Cyclotron de la Universidad de Wisconsin-Madison) en tampón HEPES (pH 8) a 37 °C durante 60 min; el pH final del marcaje se mantuvo en 7-7,5. El rendimiento del marcaje podría controlarse mediante cromatografía instantánea en capa fina radioinstantánea (iCCF). A continuación se introdujo un procedimiento de exposición al ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para eliminar cualquier ^{89}Zr unido no específicamente de la superficie de la partícula. A continuación se purificaron los NDC marcados sintetizados (^{89}Zr -DFO-FA-CDC) utilizando una columna PD-10. La pureza radioquímica final se cuantificó mediante iCCF.

[0289] Para la obtención de imágenes por PET/CT, a ratones desnudos sanos ($n = 3$) se les inyectó por vía intravenosa 200-300 μCi (7,4-11,1 MBq) de ^{89}Zr -DFO-FA-CDC. Aproximadamente 5 minutos antes de la adquisición de las imágenes PET/CT, los ratones se anestesiaron mediante inhalación de una mezcla de gas isoflurano/oxígeno al 2 % y se colocaron en la cama del escáner; la anestesia se mantuvo utilizando una mezcla de isoflurano/gas al 1 %. Las imágenes PET/CT se realizaron en un escáner PET/CT para animales pequeños (Inveon microPET/microCT) a las 1-2, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Se utilizó una ventana de energía de 350-700 keV y una ventana de temporización de coincidencia de 6 ns. Los datos se ordenaron en histogramas 2D mediante combinación de Fourier y las imágenes transversales se reconstruyeron mediante retroproyección filtrada en una matriz de $128 \times 128 \times 63$ ($0,72 \times 0,72 \times 1,3 \text{ mm}^3$). Los datos de las imágenes PET/CT se normalizaron para corregir la falta de uniformidad de la respuesta, las pérdidas en el recuento de tiempos muertos, la relación de ramificación de positrones y el deterioro físico hasta el momento de la inyección; no se aplicaron correcciones de atenuación, dispersión o promedio de volumen parcial. Las tasas de conteo en las imágenes reconstruidas se convirtieron en concentraciones de actividad (porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido, % ID/g) mediante el uso de un factor de calibración del sistema derivado de la obtención de imágenes de un fantasma equivalente en agua del tamaño de un ratón que contiene ^{89}Zr . Los análisis de la región de interés (ROI) de los datos de PET se realizaron utilizando el software IRW. A las 72 h después de la inyección, se recogieron órganos de cada ratón individual, se pesaron en húmedo y se contó la radiación gamma (Automatic Wizard2 γ -Counter, PerkinElmer). La absorción de ^{89}Zr -DFO-FA-CDC se presentó como % ID/g (media $\pm$ DE).

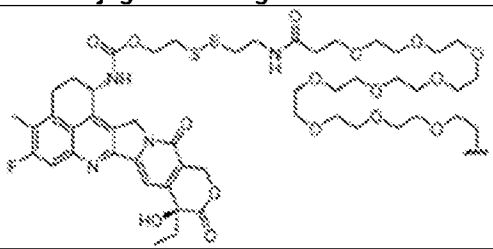
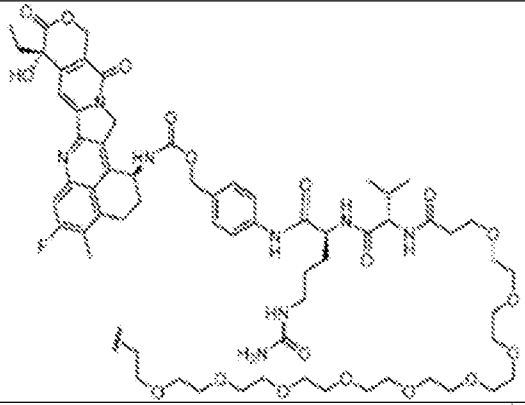
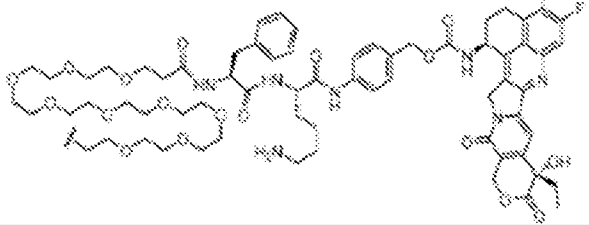
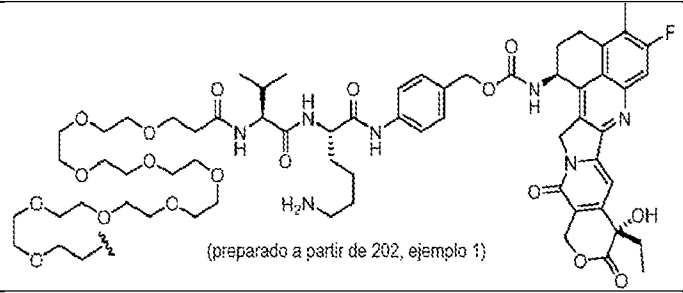
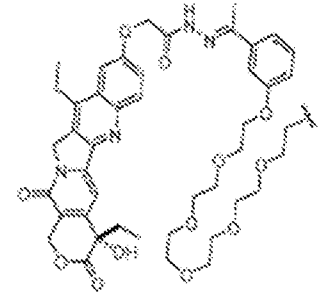
[0290] Los NDC de la presente divulgación permiten un reconocimiento preciso del tumor, una penetración profunda del tumor y una alta eficacia de destrucción de tumores. Los NDC se pueden depurar rápida y eficientemente del cuerpo, lo que reduce el potencial de toxicidades no deseadas y da como resultado un perfil de seguridad mejorado. Los NDC descritos en el presente documento (que comprenden ligandos dirigidos (ácido fólico) y carga útil (exatecán)) pueden administrarse a un sujeto y circular a través del torrente sanguíneo, atacar el cáncer (por ejemplo, tumor), difundir, penetrar, internalizar y escindir la carga útil de exatecán, matando las células cancerosas.

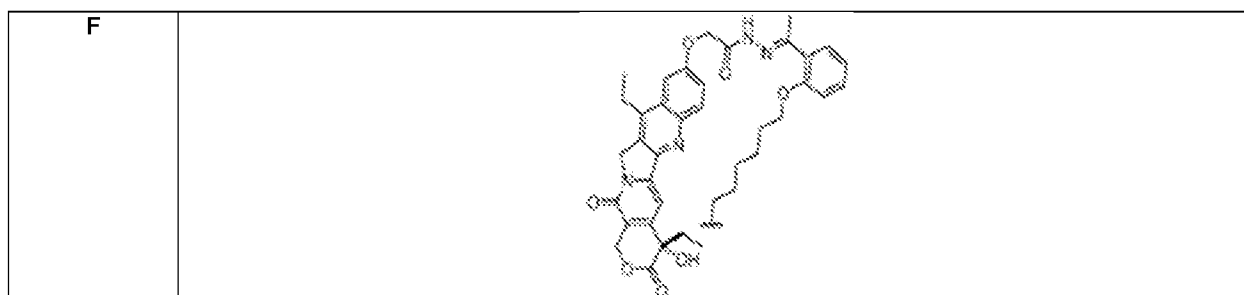
[0291] En este estudio, se probaron la depuración renal y el patrón de biodistribución de FA-CDC. Tal como se muestra en la figura 19A, después de la inyección intravenosa, el ^{89}Zr -DFO-FA-CDC circuló en el torrente sanguíneo de un ratón desnudo sano, tal como lo indica la alta señal radiactiva del corazón y la arteria. La señal radioactiva dominante también se puede ver en la vejiga del ratón, lo que demuestra la depuración renal del NDC. Después de 24 h, la mayor parte del ^{89}Zr -DFO-FA-CDC inyectado se eliminó del cuerpo del ratón. Los cambios en el patrón de biodistribución 2 horas y 24 horas después de la inyección también se muestran en la figura 19B. Tal como se esperaba, el NDC puede circular en el torrente sanguíneo con una vía de depuración renal dominante, evitando al mismo tiempo la depuración por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) (es decir, hígado y bazo).

Ejemplo 10: Modelo de tumor KB humano y estudio de eficacia *in vivo*

5 [0292] La eficacia *in vivo* del NDC se llevó a cabo utilizando un modelo de ratón con tumor KB humano. El ensayo comparó el NDC preparado según el Ejemplo 3 usando el precursor de conjugado de exatecán-carga útil 202 (Ejemplo 1; aquí marcado como D, y mostrado en la figura 20D, con los NDC indicados en la Tabla 5 a continuación (NDC A-C y EF). Cada NDC se comparó con un control y exatecán libre, y los NDC E y F se compararon con exatecán e irinotecán libres (CPT-11).

Tabla 5. NDC de ejemplo utilizados en el estudio de eficacia *in vivo*.

NDC	Conjugado de carga útil-enlazador
A	
B	
C	
D	
E	



[0293] El número de ligandos FA por partícula está entre 12 y 22; el número de conjugados de enlazador-fármaco por partícula está entre 17 y 25. Cada carga útil-enlazador se conjuga con el NDC a través de un resto de DBCO (preparado según el protocolo descrito en el Ejemplo 3).

[0294] La línea celular KB humana se adquirió de ATCC y se mantuvo en medio RPMI 1640 libre de ácido fólico/FBS al 10 % y 1 % de penicilina/estreptomicina, a menos que se especifique lo contrario. Una vez que las células KB se cultivaron para alcanzar un recuento celular adecuado, la viabilidad celular se confirmó mediante un hemocitómetro y un ensayo de tinción con azul tripán. Para la implantación subcutánea, a cada ratón se le inyectaron células KB a una densidad de 2×10^6 células/ratones a 0,1 ml de Matrigel/volumen de dilución celular por inyección en el flanco inferior izquierdo del muslo. Una vez que el volumen del tumor subcutáneo alcanzó un tamaño palpable de 75 a 150 mm³ en una cantidad requerida de ratones para este estudio, los ratones fueron aleatorizados y asignados a cada cohorte de tratamiento, lo que resultó en estadísticas comparables del volumen del tumor. Después de la aleatorización y la asignación de la cohorte de estudio, cada cohorte de dosis se trató según las vías de administración, la dosis y la pauta.

[0295] Se usaron dos niveles de dosis de cada uno de los NDC B-D en el estudio de eficacia (solo un nivel de dosis para los NDC A, E y F). Las mediciones del volumen del tumor se realizaron usando un calibrador calibrado cada dos días durante el período de tratamiento de la dosis, seguido de mediciones dos veces por semana durante el período de recuperación de la fase de vida, y los volúmenes del tumor se determinaron usando la fórmula longitud (mm) × ancho (mm) × ancho (mm) × 0,50. Las mediciones del peso corporal se realizaron cada dos días durante el período de tratamiento con dosis, seguidas de mediciones dos veces por semana durante el período de recuperación de la fase de vida. Los ratones fueron sacrificados cuando los puntos finales del estudio alcanzaron 1000 mm³. Se recogieron los tumores y se midió el tamaño del tumor. Los tumores se extirparon quirúrgicamente y se congelaron rápidamente para almacenarlos a -80 °C hasta su análisis futuro.

[0296] Las figuras 20A-20F representan los estudios de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* de los seis NDC dirigidos al receptor de folato en ratones portadores de tumores KB (n = 7). Los gráficos de crecimiento tumoral representados para el estudio de eficacia *in vivo* muestran una respuesta clara de inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con el NDC preparado según el Ejemplo 3 usando el precursor de conjugado de exatecán-carga útil 202 (del Ejemplo 1), que se muestra en la figura 20D. De manera similar, se observó inhibición del crecimiento en NDC A (figura 20A), NDC B (figura 20B) y NDC C (figura 20C). Por el contrario, los ratones tratados con NDC E (figura 20E) y NDC F (figura 20F) no mostraron una inhibición significativa en el crecimiento tumoral. Las dosis para los NDC se proporcionan en las figuras 20A - 20F. Se observó una clara respuesta de inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con NDC A-D. Los ratones del grupo de control que recibieron solución salina normal siguen el mismo régimen de dosis de Q3DX3.

Ejemplo 11: Actividad de NDC en líneas celulares resistentes a fármacos

[0297] Se llevó a cabo un ensayo utilizando los NDC descritos en el presente documento para determinar su actividad en células cancerosas resistentes a fármacos (específicamente, células KB resistentes a irinotecán y células KB resistentes a exatecán). Los NDC utilizados en este ensayo se prepararon según el Ejemplo 3, utilizando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 (del Ejemplo 1).

Desarrollo de células cancerosas positivas al receptor de folato alfa resistentes al inhibidor TOP1.

[0298] Se adquirió una línea celular KB humana sin tratar (virgen) de ATCC y se mantuvo en medio RPMI 1640 libre de ácido fólico/FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. Para desarrollar células KB resistentes al inhibidor TOP1, las células en el matraz (50-60 % de confluencia) se trataron repetidamente con concentraciones crecientes de exatecán, topotecán, SN-38 o irinotecán durante más de 4 meses. La concentración inicial del tratamiento con inhibidor de TOP1 estaba cerca de los valores de IC₉₀ de las células KB. Después de cada tratamiento, las células se lavaron cuidadosamente con medio RPMI 1640 nuevo y se dejaron proliferar durante 2-3 días adicionales hasta alcanzar una confluencia del 50-60 %. La siguiente ronda de tratamiento con inhibidor de TOP1 se inició con una concentración de inhibidor de TOP1 entre 2 y 10 veces mayor.

Factor resistente y ensayo IC₅₀

[0299] Se cultivaron células KB tanto sin tratar como resistentes al inhibidor TOP1 en medio libre de ácido fólico (RPMI1640, ThermoFisher, GIBCO). Las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos a una densidad de 3 x 10³ células por pocillo (un total de 90 µl) y se dejaron unir durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con inhibidores de TOP1 seleccionados (por ejemplo, exatecán libre) o NDC en intervalos de concentración adecuados. Después de exponer los inhibidores de TOP1 con ambos tipos de células durante el mismo período de tiempo, se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo CellTiter-Glo2.0 (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los datos de viabilidad y proliferación se representaron utilizando el software Prism7 (GraphPad). El factor de resistencia se puede calcular utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de resistencia} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ de célula KB resistente}}{\text{IC}_{50} \text{ de célula KB sin tratar}}$$

Línea celular KB resistente al irinotecán y prueba de potencia de NDC

[0300] La **figura 21A** muestra las curvas de IC₅₀ de irinotecán en células KB sin tratar y resistentes, lo que demuestra el desarrollo exitoso de 5X células KB resistentes a irinotecán, donde la IC₅₀ de irinotecán libre en células KB resistentes a irinotecán fue de 3,618 nM, en comparación con 668 nM en células KB sin tratar. La **figura 21B** proporciona las curvas de IC₅₀ del NDC (FA-CDC) (preparado según el Ejemplo 3, usando el precursor del conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1) en las células KB sin tratar (IC₅₀ = 0,27 nM) y células KB resistentes (IC₅₀ = 0,26 nM), lo que indica que el NDC tiene una alta potencia que es uniforme tanto en las células KB sin tratar como en las células KB resistentes al inhibidor TOP1.

Línea celular de KB resistente a exatecán y prueba de potencia de NDC

[0301] La **Figura 22A** muestra las curvas de IC₅₀ de exatecán en células KB sin tratar y resistentes, lo que demuestra el desarrollo exitoso de >8X células KB resistentes a exatecán, donde la IC₅₀ de exatecán en células KB regulares fue de 2 nM, en comparación con 4 nM en células KB pretratadas con 4x con exatecán, y 16,9 nM en células KB pretratadas 7x con exatecán. La **figura 22B** muestra las curvas de IC₅₀ del NDC (FA-CDC) (preparado según el Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1) en células KB sin tratar y resistentes (pretratamiento 4x o 7x), donde la IC₅₀ de FA-CDC fue 0,27 nM, 0,28 nM y 0,30 nM, respectivamente. Los resultados indicaron que el NDC posee una alta potencia de manera uniforme tanto en las células KB sin tratar y resistentes.

Ejemplo 12: Actividad de NDC en células cancerosas con niveles variados de expresión del receptor de folato

[0302] Se realizó un ensayo para determinar la citotoxicidad de NDC de ejemplo (FA-CDC), con niveles variables de relación fármaco con respecto a partícula, en diferentes líneas celulares cancerosas que sobreexpresan FR-alfa, en comparación con exatecán no conjugado. Los NDC se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 3, utilizando el precursor de conjugado de carga útil-enlazador 202, del Ejemplo 1. Los NDC (FA-CDC) analizados tenían una relación de fármaco con respecto a partícula (DPR) de 43, 20, 8 y 1 (es decir, 43, 20, 8 y 1 grupos enlazadores de exatecán por nanopartícula).

[0303] Se cultivaron células cancerosas con niveles variados de expresión de FR alfa (KB (++++), IGROV-1(++), SK-OV-3(++), HCC827(++), A549(-) y BT549(-) en medio libre de ácido fólico (RPMI1640, ThermoFisher, GIBCO) durante al menos una semana antes del estudio. Se realizaron ensayos para exposición de 7 días y exposición de 6 horas.

[0304] Las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos a una densidad de 3x10³ células por pocillo (un total de 90 µl) y se dejaron unir durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con NDC con una relación fármaco con respecto a partícula (DPR) variada en una concentración que oscilaba entre 0 y 50 nM (0, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 nM) añadiendo 10 µl de compuestos madre 10x.

[0305] Para el estudio de viabilidad con exposición de 6 horas, las células se trataron durante 6 horas y se lavaron (3x) con 100 µl de PBS. A continuación se agregaron 100 µl de medio celular nuevo a cada pocillo y la placa se incubó durante 7 días adicionales a 37 °C antes de realizar el ensayo citotóxico CellTiter-Glo® (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los resultados del ensayo de exposición de 7 días se presentan en la **figura 23**, que demuestran que el NDC era muy potente en todas las líneas celulares, a pesar de los diferentes niveles de expresión de FR en las células.

[0306] Para el estudio de viabilidad con exposición de 7 días, las células se incubaron con compuestos durante todo el período de 7 días, seguido del ensayo citotóxico CellTiter-Glo®. Los datos para la mitad de la concentración inhibidora máxima (IC₅₀) se representaron utilizando el software Prism7 (GraphPad). Los resultados del ensayo de exposición de 6 horas se presentan en la **figura 23**, que demuestran que el NDC era muy potente en todas las líneas celulares, a pesar de los diferentes niveles de expresión de FR en las células.

Ejemplo 13: Citotoxicidad de NDC en líneas celulares tumorales resistentes a Pt derivadas de pacientes

[0307] Se realizó un ensayo para establecer la citotoxicidad de un NDC de ejemplo (preparado según el Ejemplo 1, usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador, Compuesto 202 del Ejemplo 1) en diversas líneas celulares tumorales derivadas de pacientes que son resistentes a Pt, con comparación al exatecán no conjugado. Se obtuvieron líneas celulares de cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama (tanto HR+, HER2+; como HR-, HER2+; y cáncer de mama triple negativo (TNBC)), cáncer de endometrio y cánceres de cabeza y cuello (H&N). Los resultados del ensayo se proporcionan en la figura 24.

[0308] La eficacia citotóxica se determinó mediante KIYATEC usando el ensayo KIYA-PREDICT™. XenoSTART realizó la puntuación de inmunohistoquímica (IHC) de FR α del tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario, endometrio, pulmón de células no pequeñas, mama, mama triple negativo, cabeza y cuello resistentes al platino utilizando el kit de ensayo IHC para FR α de Biocare Medical (cat # BRI4006KAA), siguiendo el protocolo del fabricante. Se seleccionaron un total de 28 modelos PDX de diferentes indicaciones en función de las puntuaciones de IHC y se proporcionaron a KIYATEC para el ensayo KIYA-PREDICT™. De manera resumida, los tumores PDX criopreservados se descongelaron y se disociaron enzimáticamente en células individuales y se sembraron en microplacas esferoides de 384 pocillos (Corning). También se realizó citometría de flujo para evaluar los niveles de FR α entre diferentes modelos de PDX. Después de las 24 horas de formación de esferoides, se agregaron NDC o controles en el intervalo de concentración diseñado y se incubaron durante 7 días. Después de eso, la viabilidad celular se midió mediante CellTiter-Glo® 3D (Promega). Los datos fueron analizados en Microsoft Excel y GraphPad Prism.

Ejemplo 14: Eficacia *in vitro* e *in vivo* de un NDC de ejemplo en modelos de leucemia mieloide aguda pediátrica

[0309] Se llevaron a cabo ensayos para establecer la eficacia *in vitro* e *in vivo* de un NDC de ejemplo (preparado de acuerdo con el protocolo en el Ejemplo 3, usando el precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1) en modelos de leucemia mieloide aguda pediátricos positivos para receptor de folato alfa.

Estudio de unión celular por citometría de flujo *in vitro*

[0310] Se cultivaron células cancerosas (líneas celulares IGROV-1 y AML MV4; 11) en medio libre de ácido fólico (RPMI1640, ThermoFisher, GIBCO) durante al menos una semana antes del estudio. Los estudios de unión celular se realizaron incubando 5×10^5 células (un total de 500 μ l, 1 millón/ml) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría (con 1 % de albúmina sérica bovina (BSA)) con el NDC de ejemplo o con anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE) anti-FR alfa (anticuerpo anti-FR alfa-PE) (concentración: 10 nM) durante 60 min a 4 °C (n = 3). Se utilizaron una CDC no dirigida y un anticuerpo isotipo-PE como controles negativos para el NDC de ejemplo y el anticuerpo anti-FR alfa-PE, respectivamente. A continuación, se tiñó la suspensión celular con un kit de viabilidad (LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Thermo Fisher) durante 10-15 min. A continuación, las células se centrifugaron (2000 revoluciones por minuto, 5 min), se lavaron (2-3 veces) usando PBS frío (con 1 % de BSA) antes de resuspenderlas en PBS (con 1 % de BSA). Se analizaron muestras por triplicado en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences) (canal Cy5, 633 nm/647 nm, tinción de células vivas/muertas, 405 nm). Los resultados se procesaron utilizando el software FlowJo y Prism 7 (GraphPad).

[0311] En las **FIGS. 25A-25D** se muestran los histogramas de citometría de flujo del NDC de ejemplo y el anticuerpo anti-FR alfa-PE en comparación con los controles negativos respectivos (NDC no dirigido o anticuerpo isotipo-PE). El estudio de flujo demuestra la capacidad específica de reconocimiento de FR alfa del NDC de ejemplo tanto para las líneas celulares IGROV-1 (cáncer de ovario humano positivo de FR alfa) como para las líneas celulares de AML MV4;11.

Ensayo citotóxico *in vitro* CellTiter-Glo®

[0312] Se cultivaron células cancerosas (líneas celulares IGROV-1 y de AML MV4; 11) en medio libre de ácido fólico (RPMI1640, ThermoFisher, GIBCO) durante al menos una semana antes del estudio. Las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^3 células por pocillo (un total de 90 μ l) y se dejaron unir durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con el NDC de ejemplo a una concentración que oscilaba entre 0 y 100 nM, añadiendo 10 μ l de 10 x solución madre de NDC. Para el estudio de viabilidad con exposición más corta, las células se trataron durante 4 horas y se lavaron (3x) con 100 μ l de PBS. A continuación, se agregaron 100 μ l de medio celular nuevo sin NDC a cada pocillo y la placa se incubó durante 5 días adicionales a 37 °C antes de realizar el ensayo citotóxico CellTiter-Glo® (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los datos para la mitad de la concentración inhibidora máxima (IC₅₀) se representaron utilizando el software Prism7 (GraphPad).

[0313] La actividad citotóxica específica *in vitro* del NDC de ejemplo en cáncer de ovario humano FR alfa positivo y líneas celulares de AML MV4;11 se muestran en las **FIGS. 26A-26B**. Las células se trataron con el NDC de ejemplo en las concentraciones indicadas, se incubaron a 37 °C durante 4 horas, se lavaron y se devolvieron a la incubadora durante 5 días adicionales, antes de realizar el ensayo citotóxico CellTiter-Glo®.

Modelos de xenoinjerto derivados de líneas celulares de AML positiva de la fusión CBFA2T3-GLIS2

[0314] Se evaluó la actividad de eliminación antitumoral *in vivo* del NDC de ejemplo en modelos de xenoinjerto derivado de línea celular (CDX). Se alimentaron ratones NOD scid gamma (NSG) con comida libre de folato durante 1 semana antes de la inyección con líneas celulares de AML. A continuación, se trasplantaron entre 1 y 5 millones de líneas celulares positivas para la fusión (M07e, WSU-AML) y células diseñadas (MV4;11 FOLR+) transducidas con indicador de luciferasa a los ratones NSG mediante inyecciones en la vena de la cola. La carga de leucemia y la respuesta a los tratamientos se controlaron mediante imágenes bioluminiscentes no invasivas (tanto de la parte delantera como de la parte posterior del ratón), y el análisis de citometría de flujo de la sangre periférica del ratón extraída mediante sangrados submandibulares se llevó a cabo quincenalmente, a partir del primer día de la semana de tratamiento con los CDC. Los ratones fueron monitorizados para detectar síntomas de enfermedad (incluyendo taquipnea, joroba, pérdida de peso persistente, fatiga y parálisis de las extremidades traseras). Los ratones del grupo de control de solución salina (Cohorte 1) fueron sacrificados debido a la alta carga de AML el día 44 después de la inyección de leucemia (se recogieron tejidos que incluían sangre, médula ósea, timo, hígado, pulmones y bazo en la necropsia y se analizaron para detectar la presencia de células leucémicas). Los ratones de los grupos de tratamiento (cohortes 2 a 4) continuaron recibiendo imágenes bioluminiscentes y control de peso corporal semanalmente. En la **figura 31** se muestra la línea de tiempo para la preparación, tratamiento y obtención de imágenes de los ratones.

[0315] Todos los ratones se aleatorizaron antes de la dosificación y se pesaron para proporcionar la dosis diseñada correcta según la Tabla 6 a continuación. La carga de leucemia y la respuesta a los tratamientos se monitorizaron semanalmente mediante imágenes bioluminiscentes no invasivas. El peso corporal se midió cada dos días. Los ratones fueron eliminados si su pérdida de peso superaba el 20 %.

Tabla 6. Diseño de dosis (n = 5 por grupo)

Cohorte	Material administrado	Fase de estudio	Dosis (mg/kg de exatecán)	Regimen	Volumen dosis IV (ml/kg)	Observaciones clínicas y puntos finales de estudio
1	Solución salina normal	Control vehículo	n/ap	Q3D x 3	10	· Peso corporal (BW) cada dos días · Punto final: Pérdida de peso superior al 20 %
2	NDC	escalado	0,33	Q3D x 6	10	
3	NDC	escalado	0,50	Q3D x 3	10	
4	NDC	escalado	0,65	Q3D x 3	10	

[0316] La **figura 27** proporciona el cambio de peso corporal de ratones con AML tratados con solución salina normal y el NDC de ejemplo en los tres niveles de dosis indicados en la Tabla 6. El grupo de solución salina normal (cohorte 1) mostró una pérdida de peso corporal dentro del 20 %, principalmente debido a la carga de leucemia. En el grupo de dosis de 0,33 mg/kg (Q3Dx6) (cohorte 2), 4 de 5 ratones toleraron bien el NDC (pérdida < 20 %) y se ganó peso corporal después de 6 dosis; mientras que el ratón restante mostró > 20 % de pérdida de peso corporal después de la quinta dosis, y más pérdida de peso corporal después de la sexta dosis. En el grupo de dosis de 0,50 mg/kg (Q3Dx3) (cohorte 3), los 5 ratones toleraron bien el NDC (pérdida < 20 %) y se ganó peso corporal después de 3 dosis. En el grupo de 0,65 mg/kg (Q3Dx3) (Cohorte 4), 2 de 5 ratones toleraron bien el NDC (pérdida < 20 %) y ganaron peso corporal después de 3 dosis, mientras que 3 de 5 ratones mostraron una pérdida de peso corporal > 20 % después de la tercera dosis.

[0317] La **figura 28** proporciona las imágenes de bioluminiscencia (BLI) *in vivo* obtenidas de los ratones con AML tratados con solución salina normal o el NDC de ejemplo en cada régimen de dosis (es decir, cohortes 1-4 de la Tabla 6). En la **figura 29** se proporciona el análisis de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* cuantitativa de las cohortes 1-4 (es decir, ratones con AML tratados con solución salina normal o el NDC de ejemplo a cada régimen de dosificación indicado en la tabla 6). En el grupo de solución salina normal (Cohorte 1), la carga de leucemia continuó progresando, con la señal BLI promedio de todo el cuerpo aumentando >90 veces en 34 días, mientras que en los 3 grupos de tratamiento (cohortes 2-4) se logró una supresión rápida y dependiente de la dosis de la carga de leucemia. El grupo de dosis de 0,5 mg/kg (Q3Dx3) (cohorte 3) mostró una carga de leucemia 11 veces menor el día 34 en comparación con la carga del día 1 después de la inyección de leucemia. Al comparar el grupo de dosis de 0,33 mg/kg (Q3Dx6) (Cohorte 2) con el grupo de dosis de 0,65 mg/kg (Q3Dx3) (Cohorte 4), se toleró mejor 0,33 mg/kg con una respuesta ligeramente mejor. En conjunto, estos datos indican que el NDC de ejemplo suprimió con éxito la carga de leucemia en los ratones con AML FR alfa positivos y mostró una respuesta rápida y dependiente de la dosis.

[0318] La **figura 30** proporciona un gráfico que ilustra los resultados de la aspiración de médula ósea de las cohortes 1-4 (es decir, los ratones tratados con solución salina normal o el NDC de ejemplo en cada grupo de dosis indicado en la Tabla 6) el día 42 después de la inyección de leucemia. Se detectó leucemia en el grupo de ratones tratados con solución salina normal (cohorte 1), mientras que no se pudo observar una carga de leucemia detectable en ninguno de los ratones de los grupos de tratamiento (cohortes 2-4).

Ejemplo 15. Estabilidad del enlazador derivado del dieno

[0319] Para determinar la estabilidad de los NDC descritos en el presente documento preparados usando un enfoque de funcionalización basado en dieno, se comparó la estabilidad de los NDC preparados usando un enfoque de funcionalización basado en dieno con los NDC preparados usando un enfoque de funcionalización basado en amina.

[0320] Los NDC se incubaron en solución salina al 0,9 %, PBS, plasma humano (10 %) y plasma de ratón (10 %) a 37 °C en un baño seco con agitación durante diferentes períodos de tiempo. Antes del análisis, las proteínas plasmáticas de las muestras se eliminaron mediante precipitación, a través de la adición de un volumen equivalente de acetonitrilo frío, seguido de centrifugación a 10.000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5425. Después de la centrifugación, el sobrenadante transparente se transfirió del tubo de centrifuga a un vial de HPLC transparente de recuperación total. El sobrenadante libre de cualquier agregación visible se diluyó con un volumen equivalente de agua desionizada para ajustar la matriz de la muestra para que coincidiera con las condiciones iniciales de la separación por HPLC y evitar la pérdida de sensibilidad. A continuación, se cuantifica la pureza y la impureza de cada muestra mediante RP-HPLC.

[0321] Los NDC dirigidos producidos usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 3, usando el precursor de dieno-silano exhibieron una alta estabilidad en plasma de ratón y humano, y mostraron una mejora significativa de la estabilidad, en relación con los NDC correspondientes producidos usando un precursor de amina-silano (ver Figuras 33A y 33B)). En los NDC preparados utilizando el precursor dieno-silano, más del 95 % de los fármacos exatecán permanecen en los NDC durante hasta 7 días en plasma de ratón y humano, obtenido mediante los espectros UV-Vis de los picos de NDC en cromatogramas de RP-HPLC. Paralelamente, un ensayo independiente de RP-HPLC que controlaba el exatecán libre sugirió que el exatecán liberado estaba por debajo del límite de detección de RP-HPLC, es decir, 0,02 %, y la ausencia de fármaco libre no deseado demuestra aún más su alta estabilidad plasmática. Los NDC dirigidos también mostraron una alta estabilidad de almacenamiento a 4 °C en solución salina al 0,9 %. Su pureza, distribución de tamaño y diámetro hidrodinámico se caracterizaron por RP-HPLC, SEC y FCS respectivamente, y permanecieron sin cambios durante 6 meses en condiciones de almacenamiento. Esta alta estabilidad en almacenamiento es otro parámetro clave importante tanto para la traslación clínica como para la fabricación comercial.

Ejemplo 16. Estudio de farmacocinética y toxicología

[0322] Se evaluaron la farmacocinética y la toxicología de un NDC de ejemplo en un modelo de rata y en un modelo de perro. El NDC utilizado en este estudio se preparó según el Ejemplo 3, utilizando el compuesto precursor de conjugado de exatecán-enlazador 202 del Ejemplo 1. Tal como se demuestra en los ejemplos anteriores, este NDC de ejemplo es altamente estable en plasma y provoca eficacia antitumoral en una variedad de líneas celulares y modelos tumorales derivados de PDX tanto *in vitro* como *in vivo*.

[0323] En estudios de toxicología y toxicocinética (TK) de dosis repetidas de 15 días realizados en ratas Wistar Han y perros Beagle, el NDC fue tolerado hasta 0,87 mg/kg/día en ratas y 0,174 mg/kg/día en perros según la concentración de exatecán conjugado cuando se administra en una pauta QWx3 mediante una infusión de 1 hora. Las toxicidades relacionadas con la dosis observadas para ambas especies se limitaron a la médula ósea y el tracto gastrointestinal. Estos son los mismos órganos que los observados cuando se administró la carga útil libre (exatecán), lo que sugiere que la administración de exatecán conjugado al NDC no amplió el perfil de toxicidad tisular. Las toxicidades observadas se recuperaron o redujeron sustancialmente al final de un período de recuperación de dos semanas. No se observaron toxicidades hepáticas, renales, pulmonares u oculares relacionadas con el fármaco, y no hubo muertes relacionadas con el fármaco en el estudio de toxicidad de dosis repetidas.

[0324] Los parámetros TK, estimados en el estudio GLP de 15 días, revelaron valores de exposición plasmática similares en machos y hembras para el NDC, exatecán total (conjugado y liberado) y exatecán liberado. El NDC exhibió una semivida circulatoria promedio de aproximadamente 15 a 20 horas en ratas y de 24 a 29 horas en perros, sin que se observara acumulación de NDC, exatecán total o exatecán libre desde el día 1 al día 15. Basado en AUC_{0-última} (hora * ng/mL) los niveles de carga útil liberada en la circulación fueron menos de aproximadamente 0,3 % y 0,1 % de los niveles de carga útil total en la rata y el perro, respectivamente. No se indujeron anticuerpos antifármaco NDC en ninguna de las especies. En resumen, el NDC tiene un perfil favorable de seguridad no clínica/TK.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de nanopartícula-fármaco (NDC) que comprende:

- (a) una nanopartícula de sílice;
 (b) polietilenglicol (PEG) que está unido de manera covalente a la superficie de la nanopartícula;
 (c) un ligando dirigido que comprende ácido fólico, en el que el ligando dirigido está unido a la nanopartícula directa o indirectamente a través de un grupo espaciador; y
 (d) un conjugado de enlazador-carga útil, en el que:

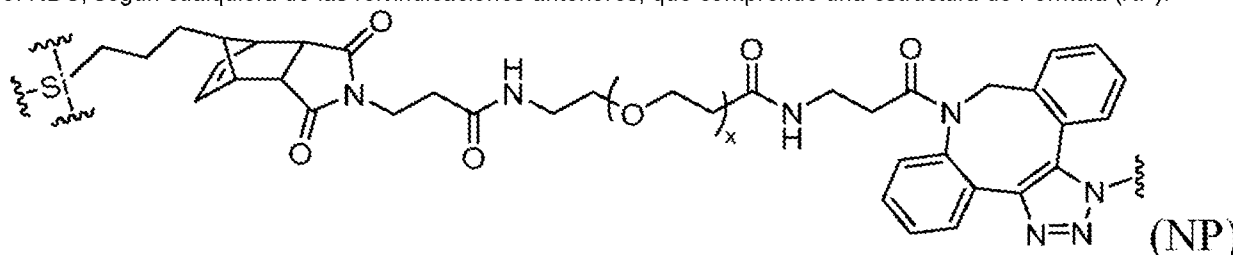
- (i) la carga útil es exatecán;
 (ii) el conjugado de enlazador-carga útil está unido a la nanopartícula a través de un grupo espaciador;
 (iii) el enlazador es un enlazador escindible por proteasa; y
 (iv) el exatecán se libera tras la escisión del enlazador.

2. NDC, según la reivindicación 1, en el que el NDC tiene un diámetro promedio entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm, o entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 8 nm.

3. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el número promedio de moléculas de exatecán en cada nanopartícula es de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, y/o en el que el número promedio de moléculas de ácido fólico en cada nanopartícula es de aproximadamente 1 a aproximadamente 30.

4. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un compuesto fluorescente que está encapsulado de manera covalente dentro de la nanopartícula.

5. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una estructura de Fórmula (NP):



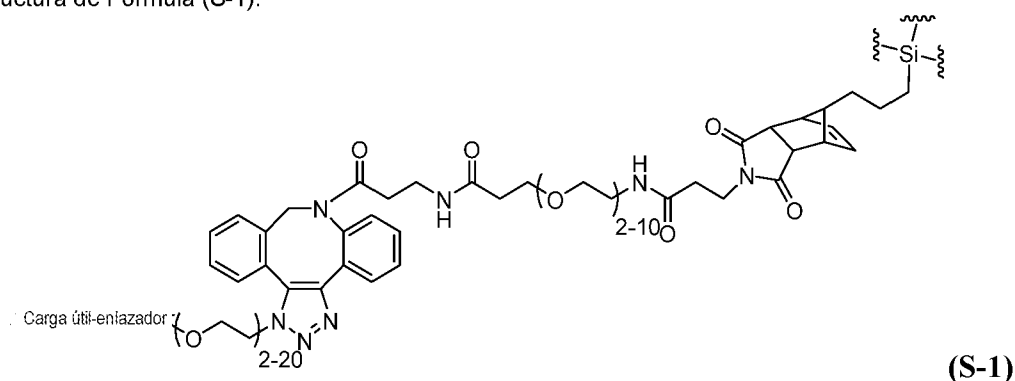
en la que
 x es un número entero de 0 a 20;
 el átomo de silicio es parte de la nanopartícula; y

el  adyacente al resto de triazol indica un punto de unión a un ligando dirigido o un conjugado de carga útil-enlazador, ya sea directa o indirectamente a través de un enlazador o grupo espaciador.

6. NDC, según la reivindicación 5, en el que el grupo espaciador es un resto de PEG.

7. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

(a) una estructura de Fórmula (S-1):



(S-1)

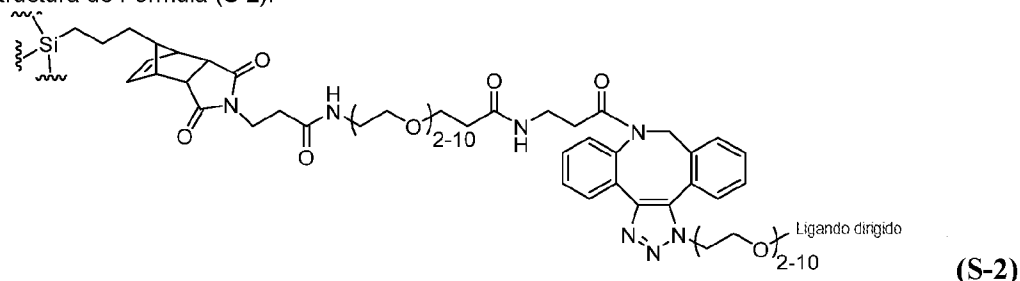
en la que

la carga útil es exatecán;

5 el enlazador es un enlazador escindible por proteasa o un enlazador escindible por catepsina B, y

el átomo de silicio es parte de la nanopartícula; y/o

(b) una estructura de Fórmula (S-2):



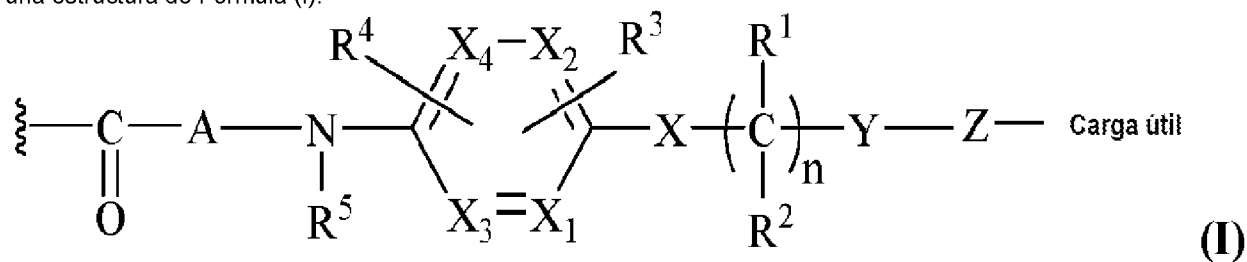
10 en la que

el ligando dirigido es ácido fólico; y

el átomo de silicio es parte de la nanopartícula.

8. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el conjugado de enlazador-carga útil comprende

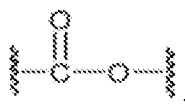
15 una estructura de Fórmula (I):



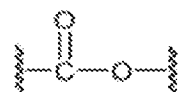
o una sal de la misma,

en la que

20 representa una unión a la nanopartícula a través de un grupo espaciador;
A es Val-Lys;
la carga útil es un residuo de exatecán, en la que Z representa una amina de exatecán (-NR^c); R¹, R², R³, R⁴ y
25 R⁵ en cada caso son de manera independiente hidrógeno;
X está ausente;
Y es



30 en el que el carbonilo en



35 está unido a Z;

X₁, X₂, X₃ y X₄ son cada uno de manera independiente -CH-;

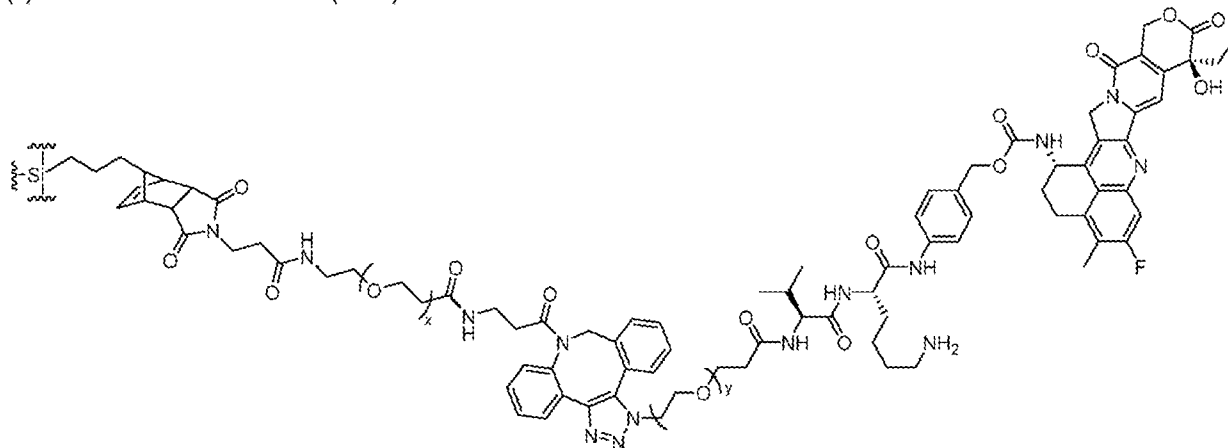
R^c es hidrógeno; y

n es 1.

9. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteasa comprende una serina proteasa o una cisteína proteasa.

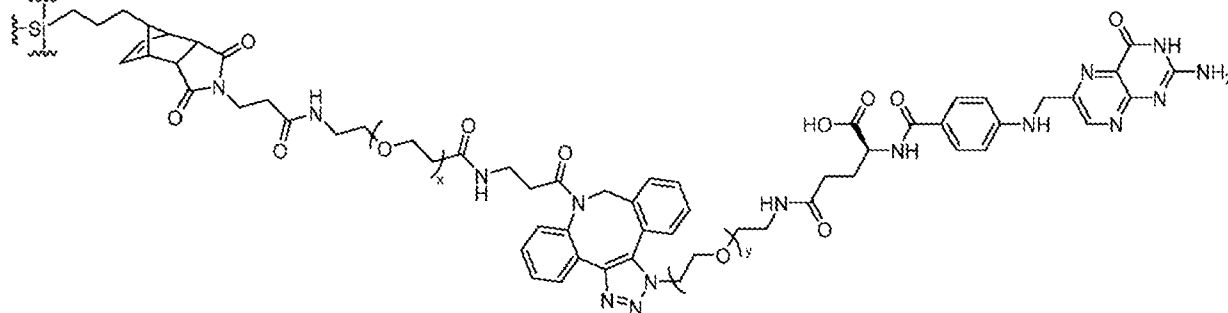
10. NDC, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

5 (a) una estructura de Fórmula (NP-3):



en la que x es 4 e y es 9, y en la que el átomo de silicio es parte de la nanopartícula; y

(b) una estructura de Fórmula (NP-2):



en la que x es 4 e y es 3, y el átomo de silicio es parte de la nanopartícula.

11. NDC, según la reivindicación 10, en el que el NDC comprende entre 1 y 30 moléculas de Fórmula (NP-3), y/o en el que el NDC comprende entre 1 y 20 moléculas de Fórmula (NP-2).

12. NDC, según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, que comprende además un colorante fluorescente encapsulado de manera covalente dentro del núcleo de la nanopartícula.

13. NDC, según la reivindicación 4 o la reivindicación 12, en el que el compuesto fluorescente o colorante fluorescente es un colorante Cy5.

14. Composición farmacéutica que comprende un NDC, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Composición farmacéutica, según la reivindicación 14, en la que la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa, y/o en la que la composición farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria.

16. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, para su utilización en el tratamiento del cáncer.

17. NDC o composición para su utilización, según la reivindicación 16, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de útero, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de tiroides, cáncer de piel, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML).

18. NDC o composición para su utilización, según la reivindicación 17, en la que el cáncer gastrointestinal es cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto o cáncer de estómago, o en la que la AML es AML pediátrica.

19. NDC, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 14 o la reivindicación 15, para su utilización en medicina.

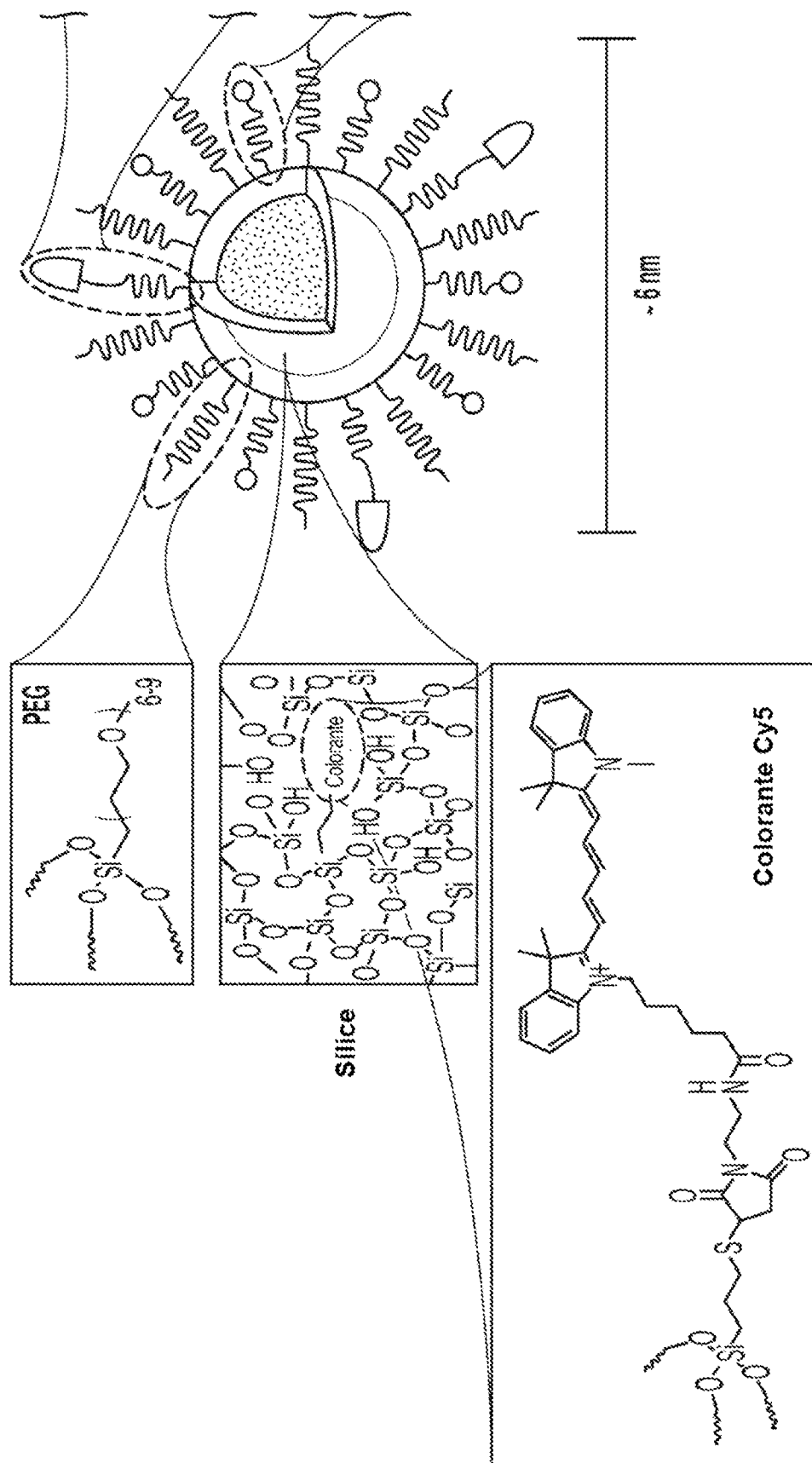


FIG. 1

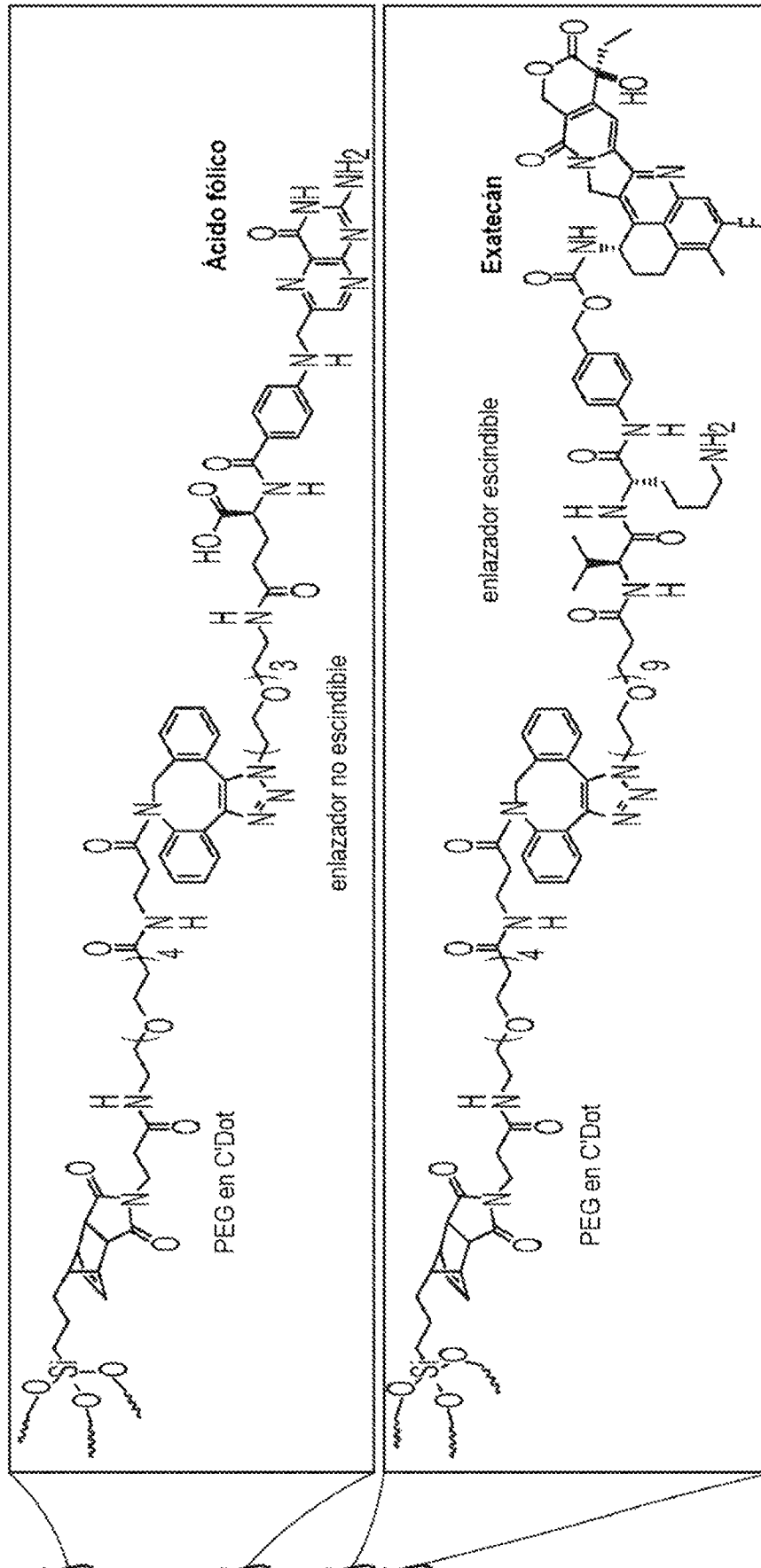


FIG. 1
CONTINUACIÓN

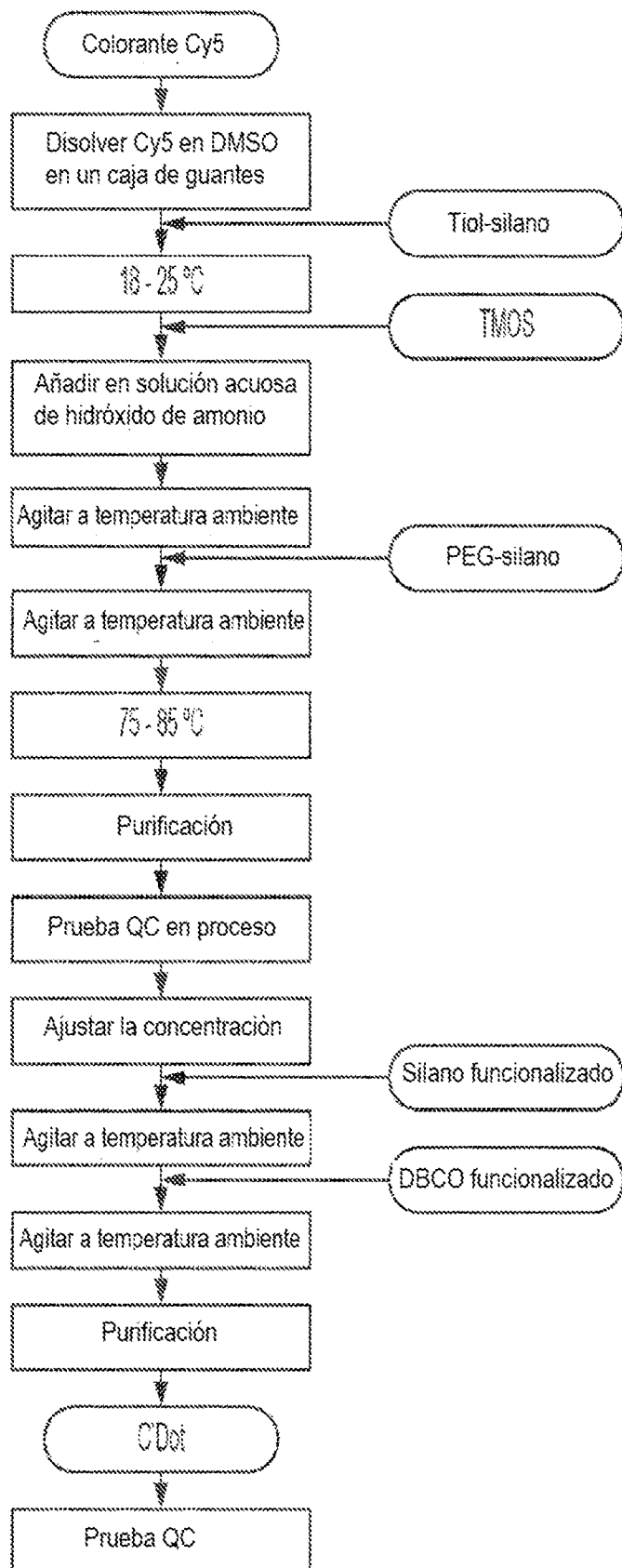


FIG. 2

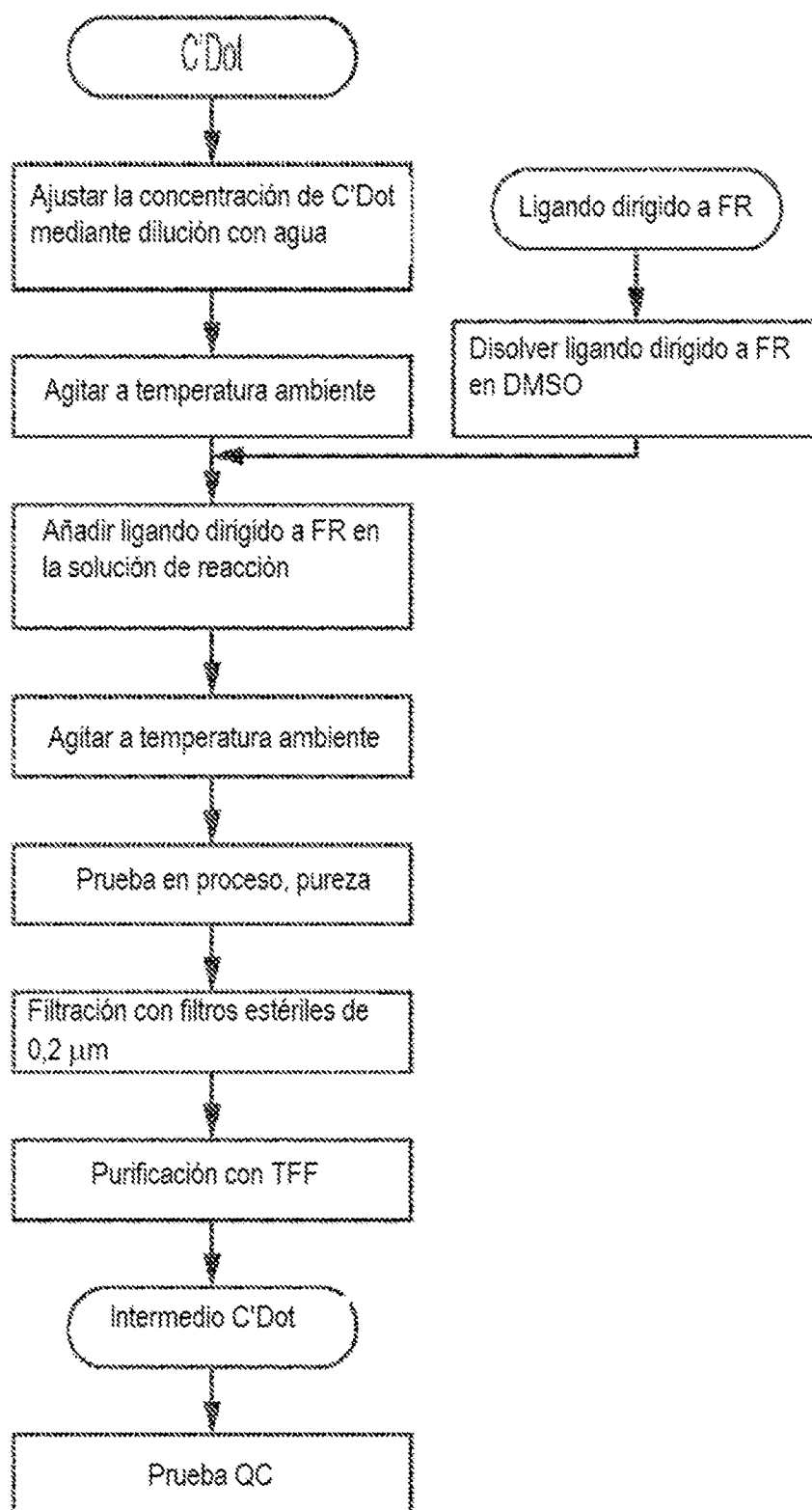


FIG. 3

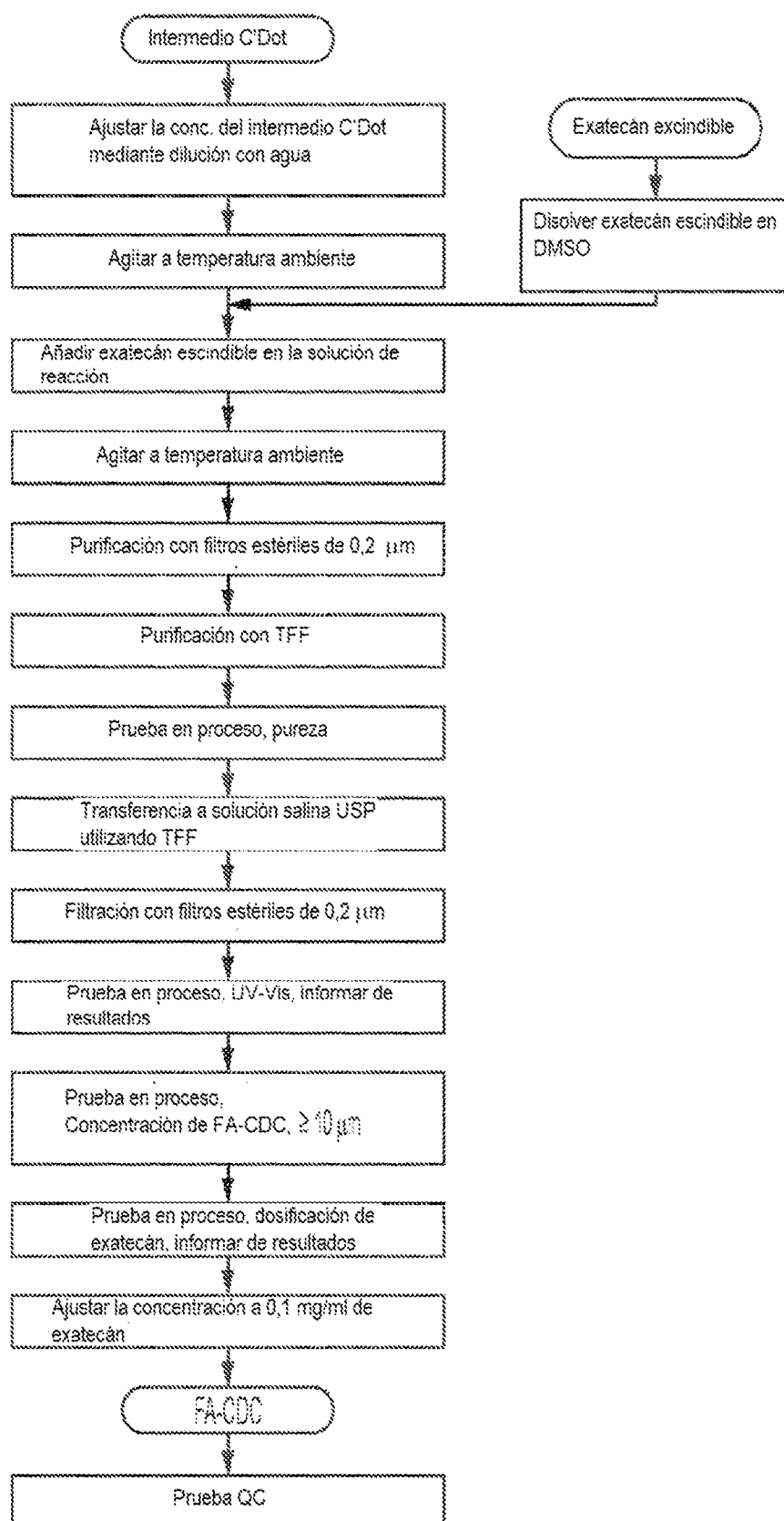


FIG. 3
CONTINUACIÓN

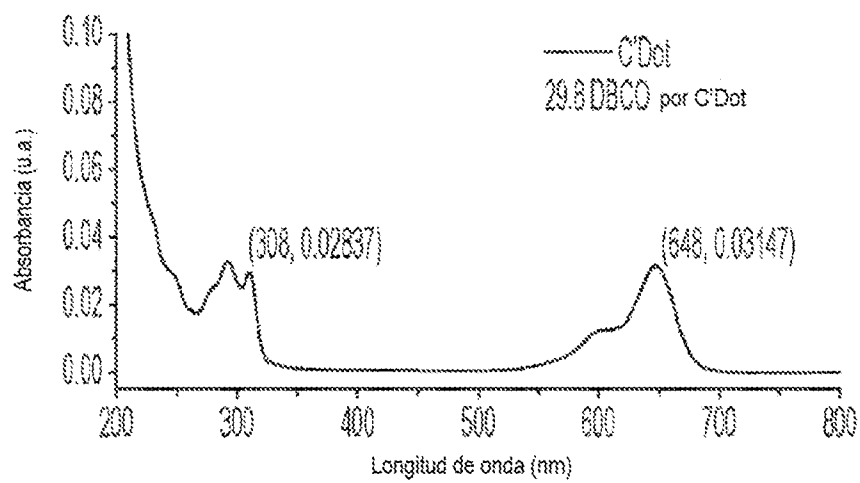


FIG. 4

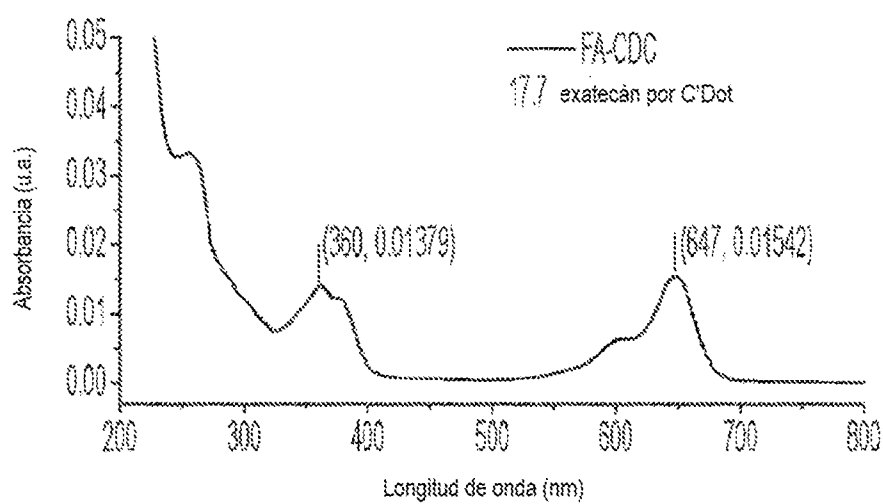
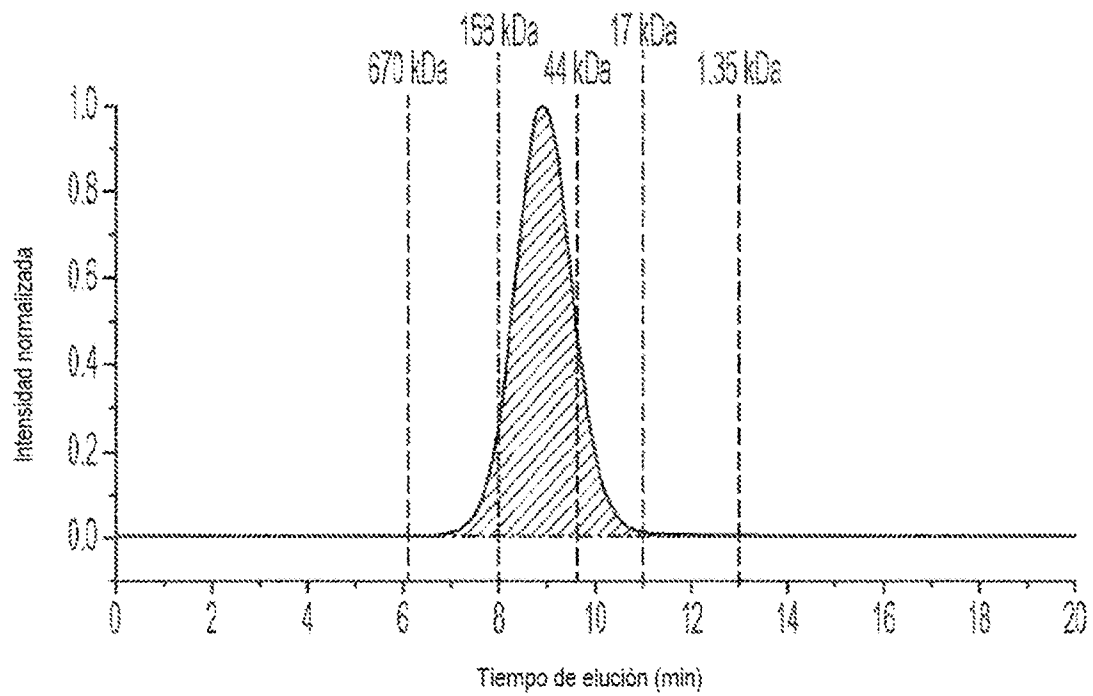
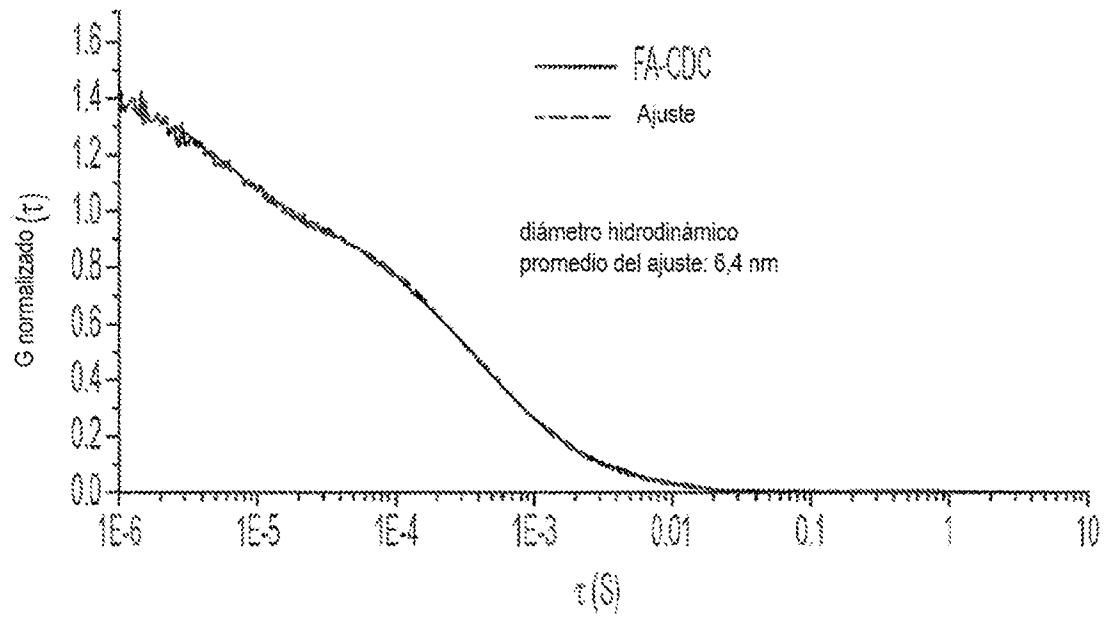


FIG. 5



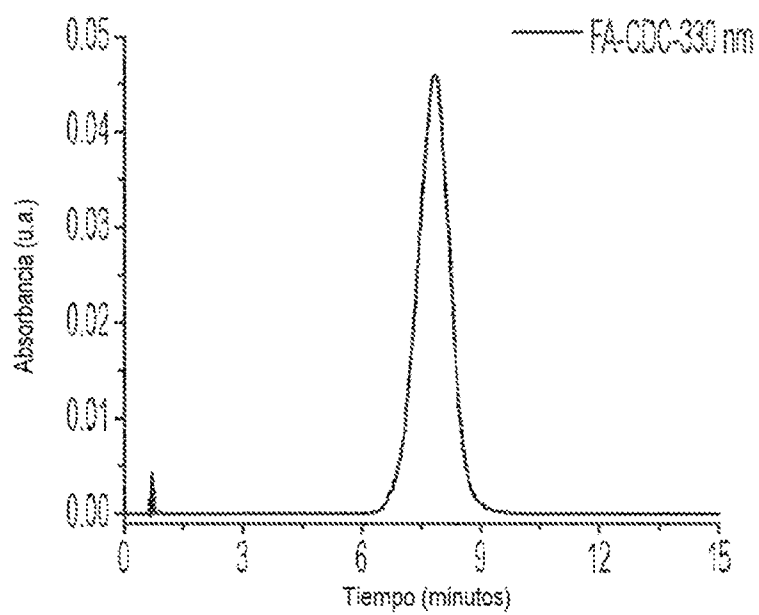


FIG. 8

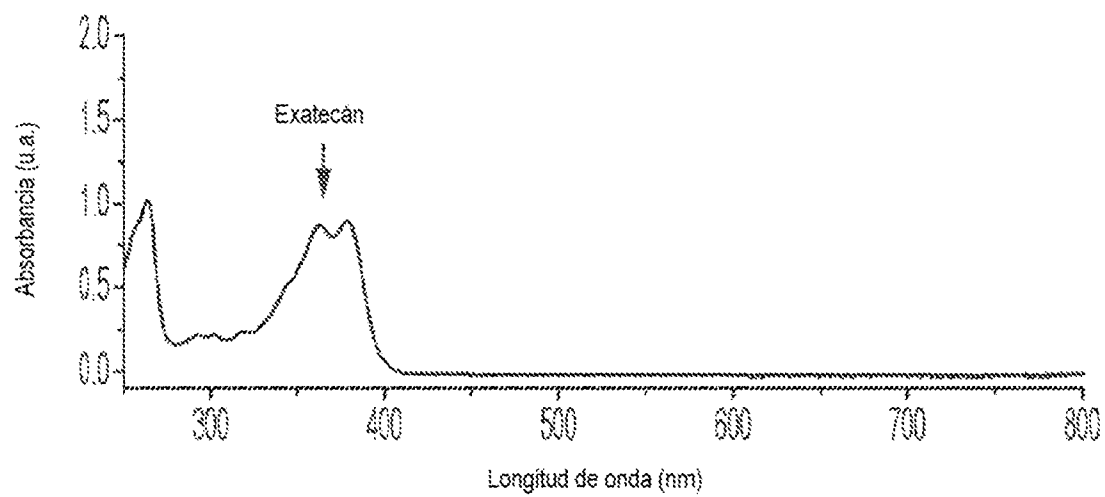


FIG. 9

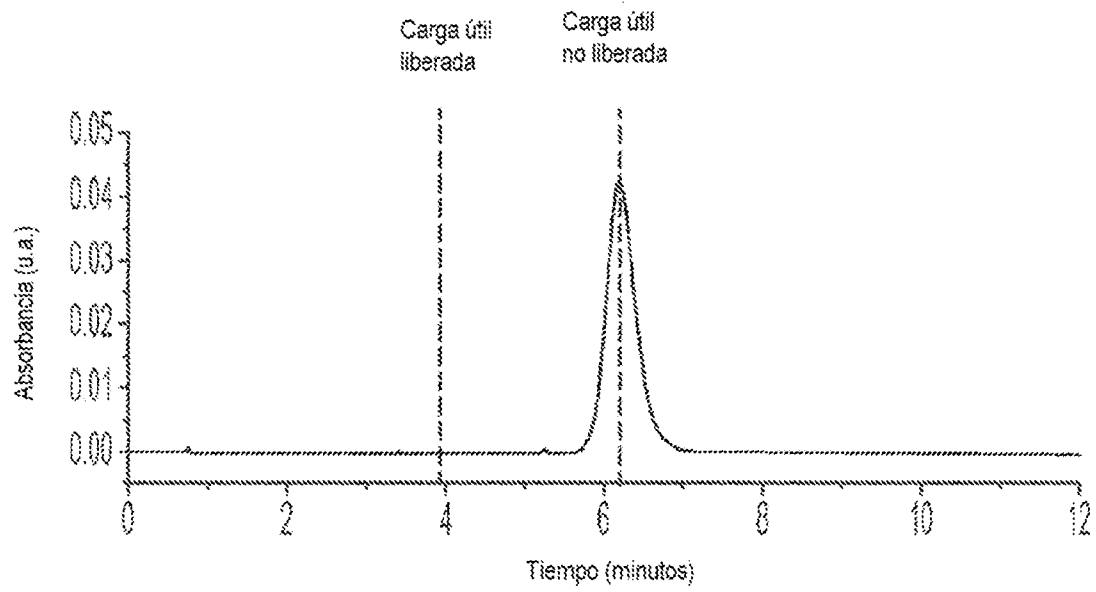


FIG. 10A

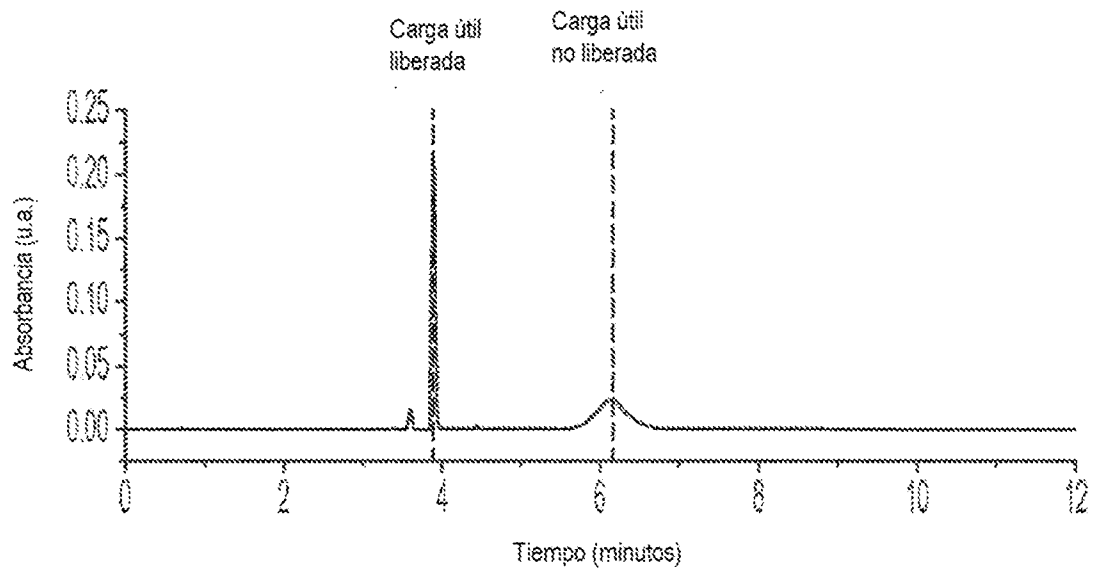


FIG. 10B

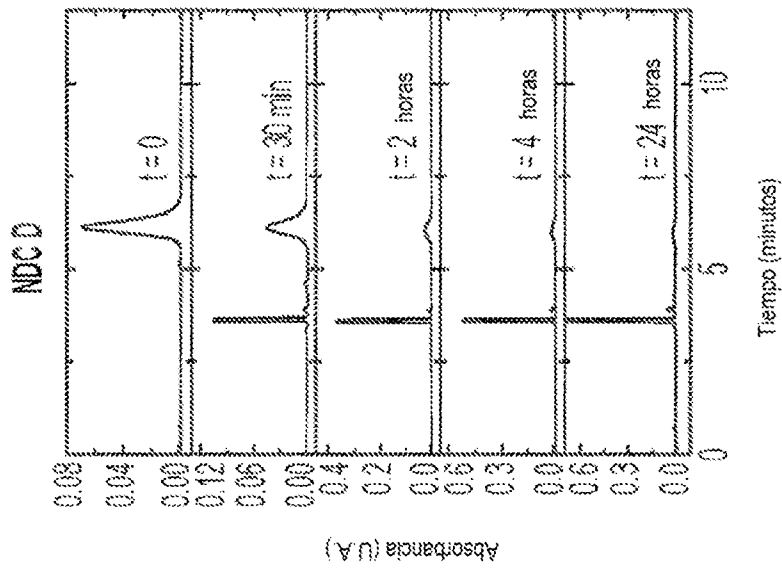


FIG. 11A

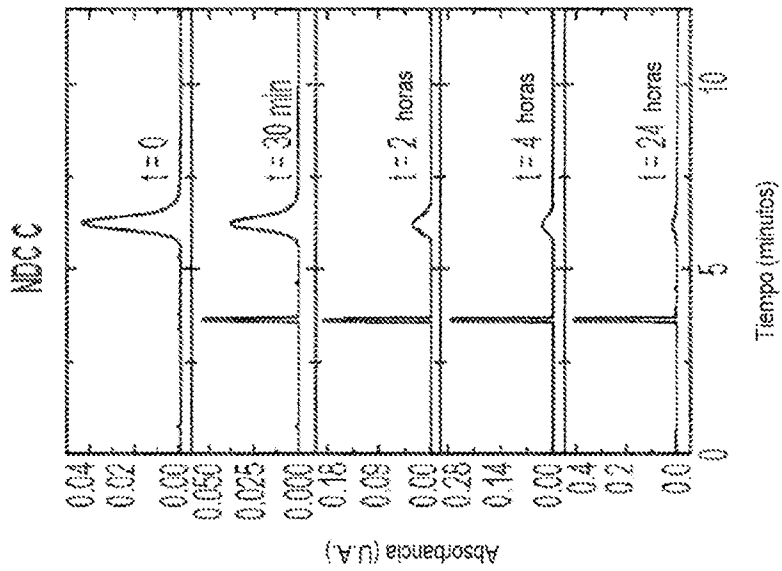


FIG. 11B

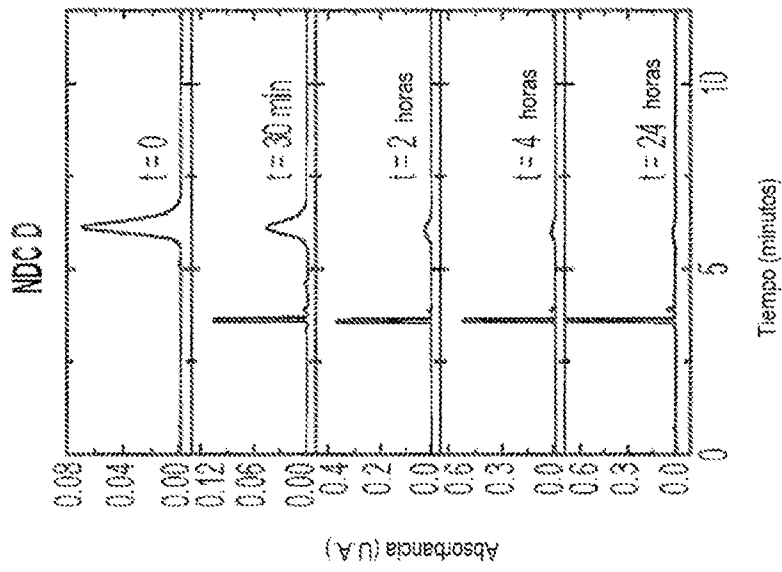


FIG. 11C

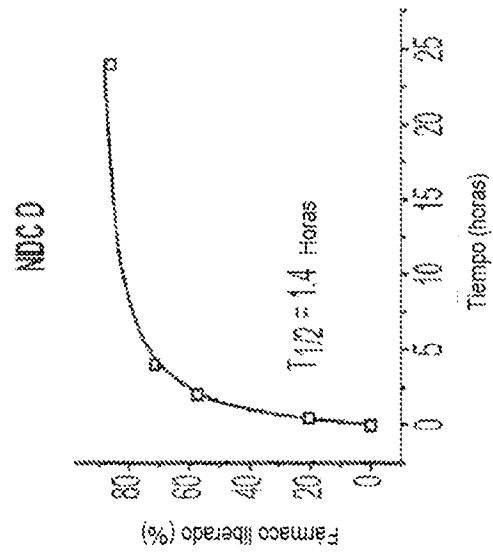


FIG. 12C

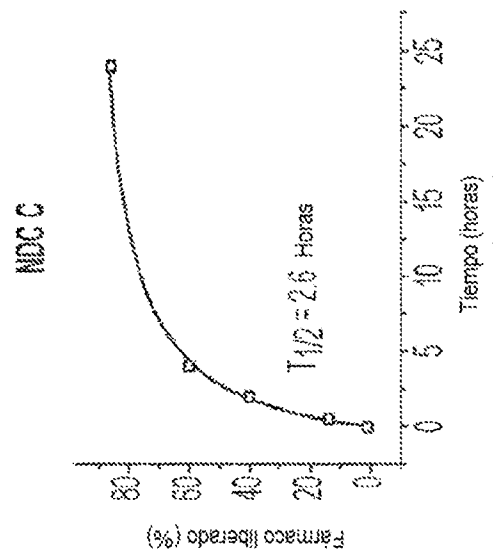


FIG. 12B

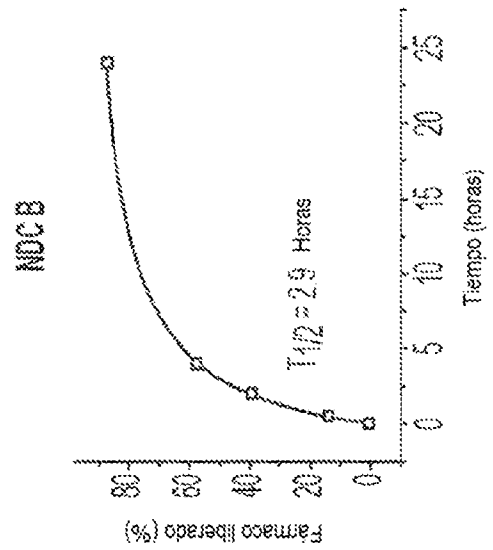


FIG. 12A

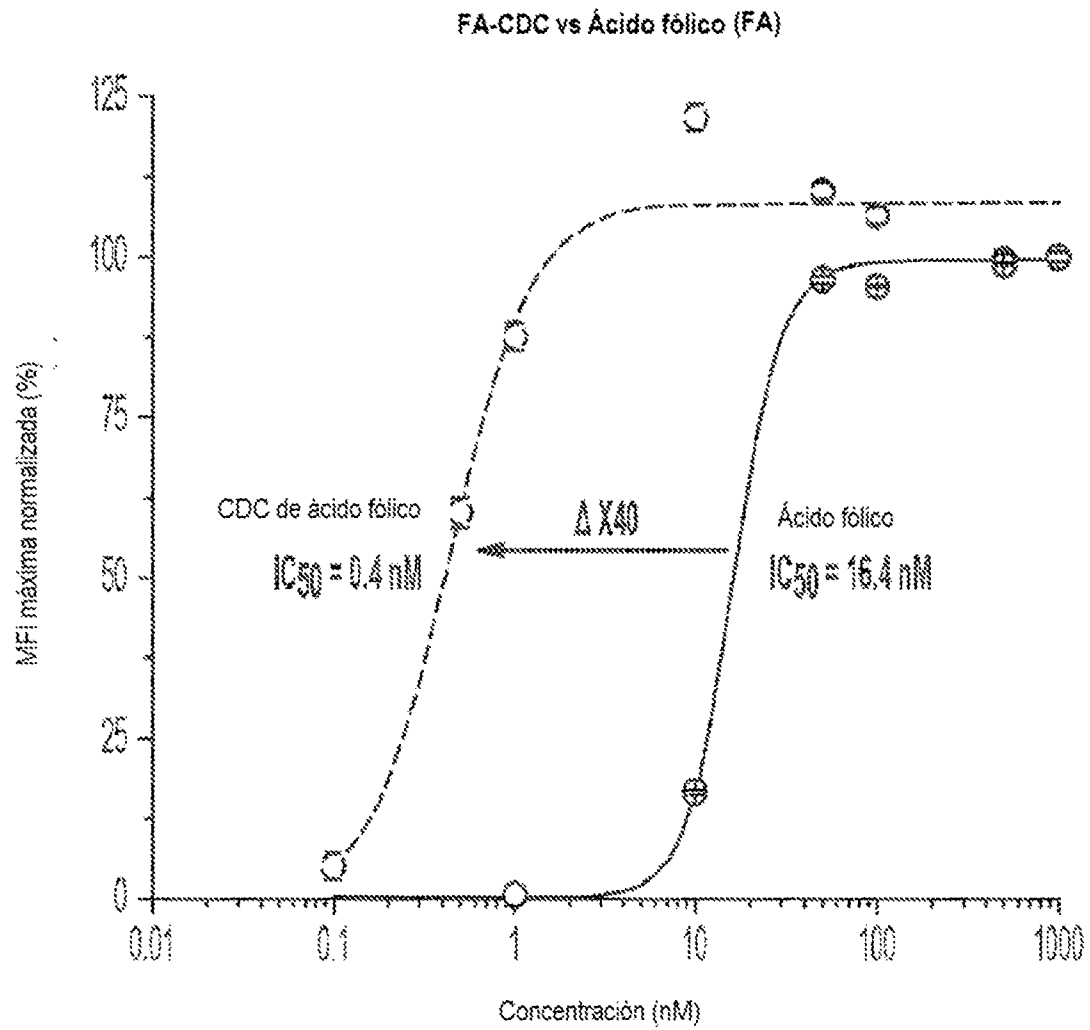


FIG. 13

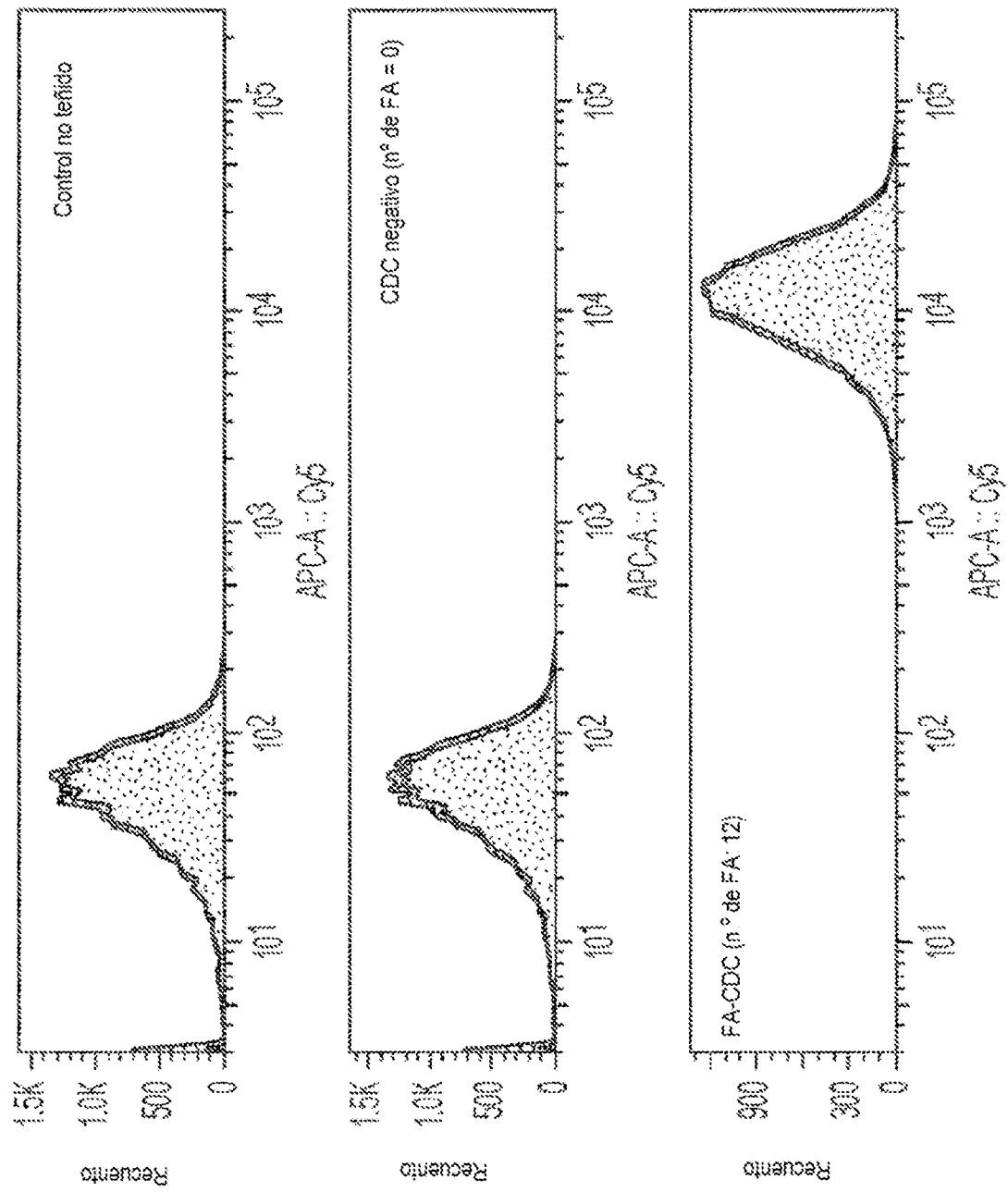


FIG. 14

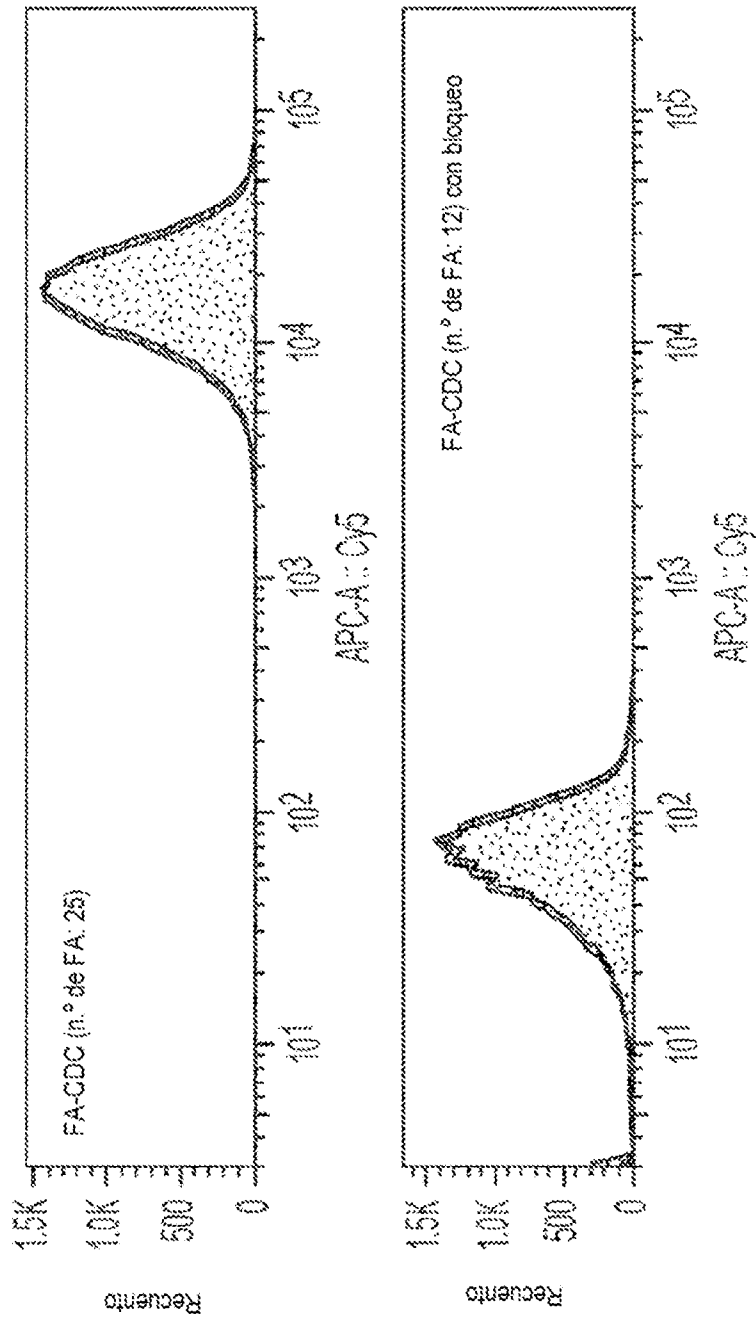


FIG. 14
CONTINUACIÓN

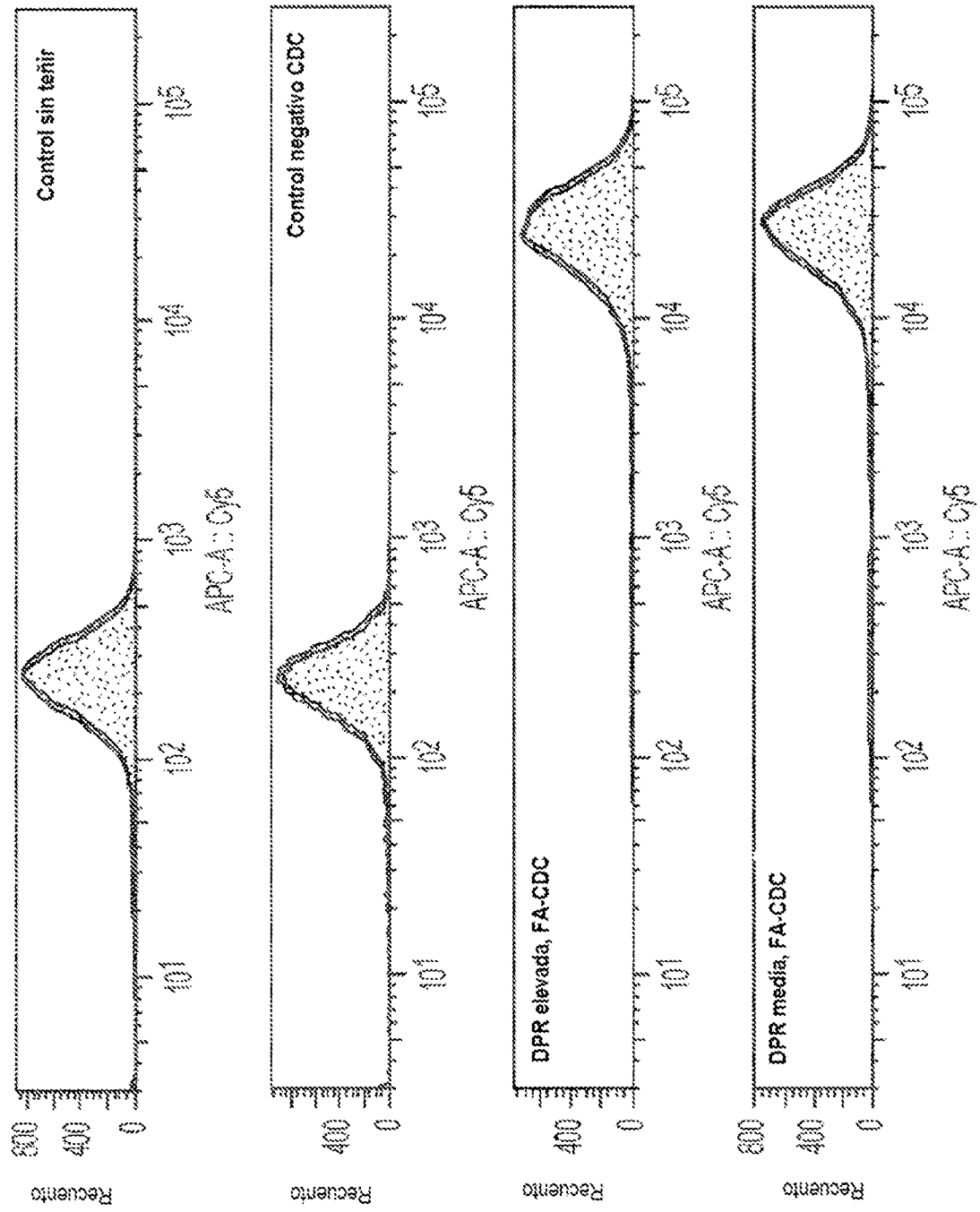


FIG. 15

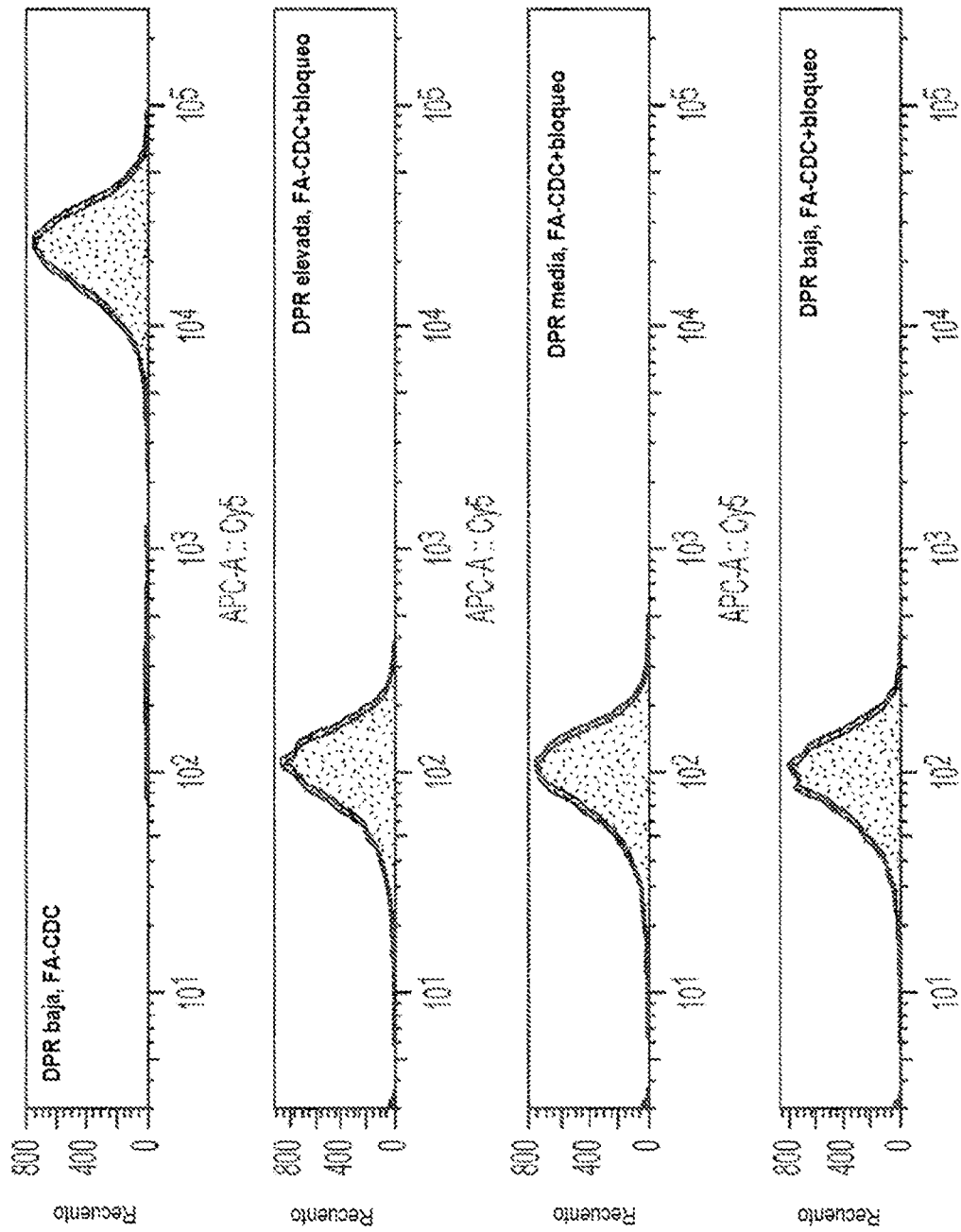


FIG. 15
CONTINUACIÓN

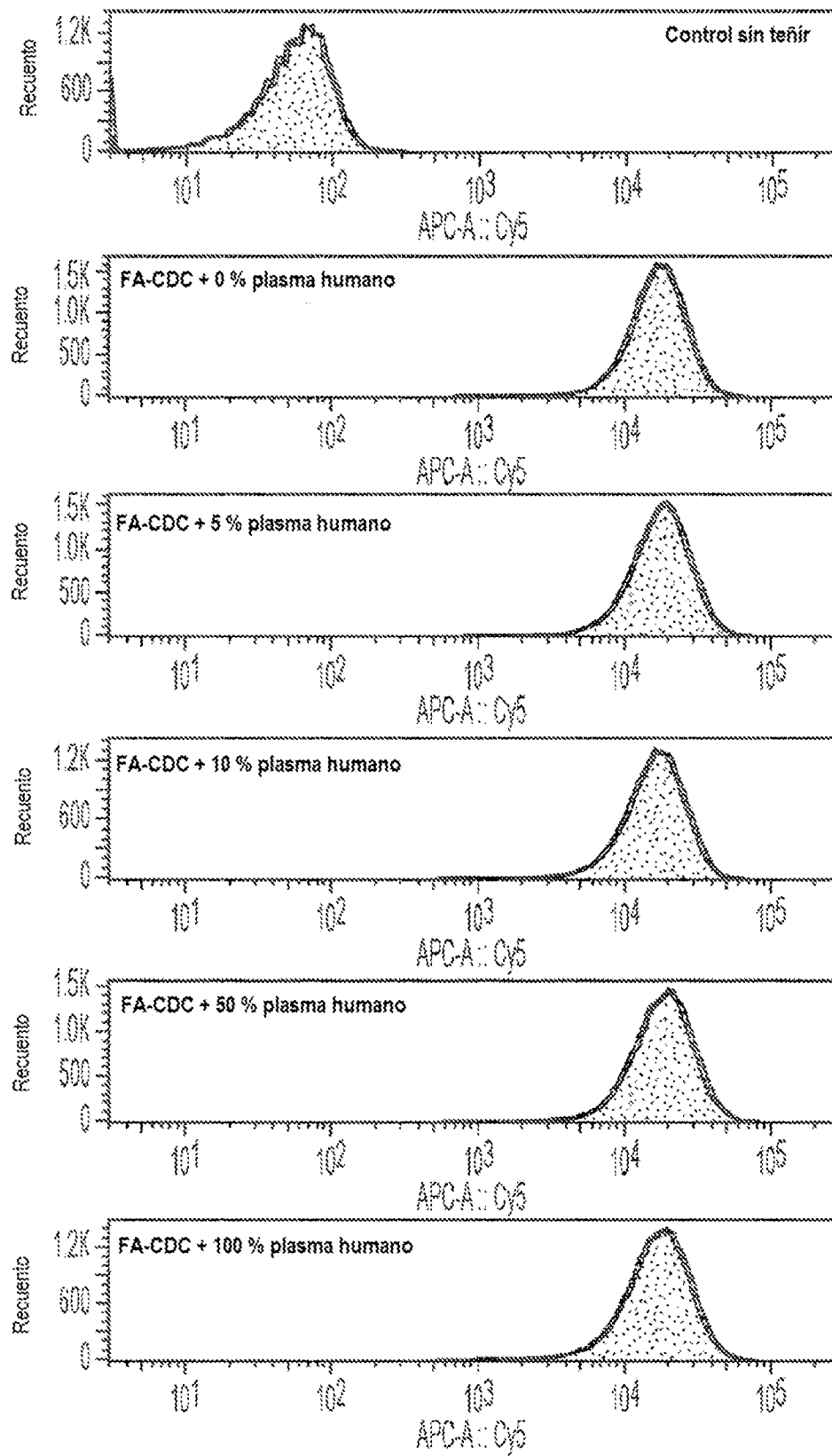


FIG. 16

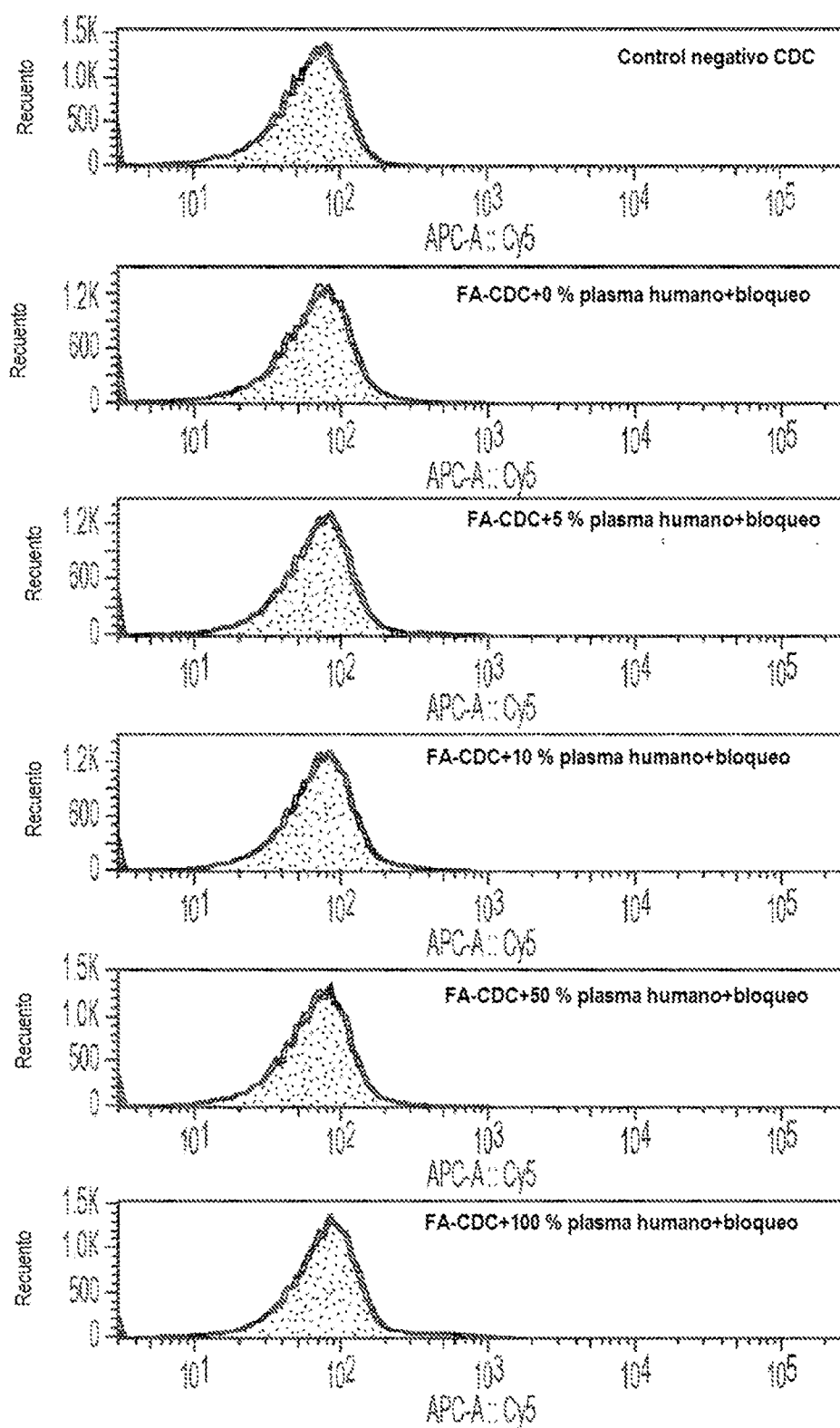


FIG. 16
CONTINUACIÓN

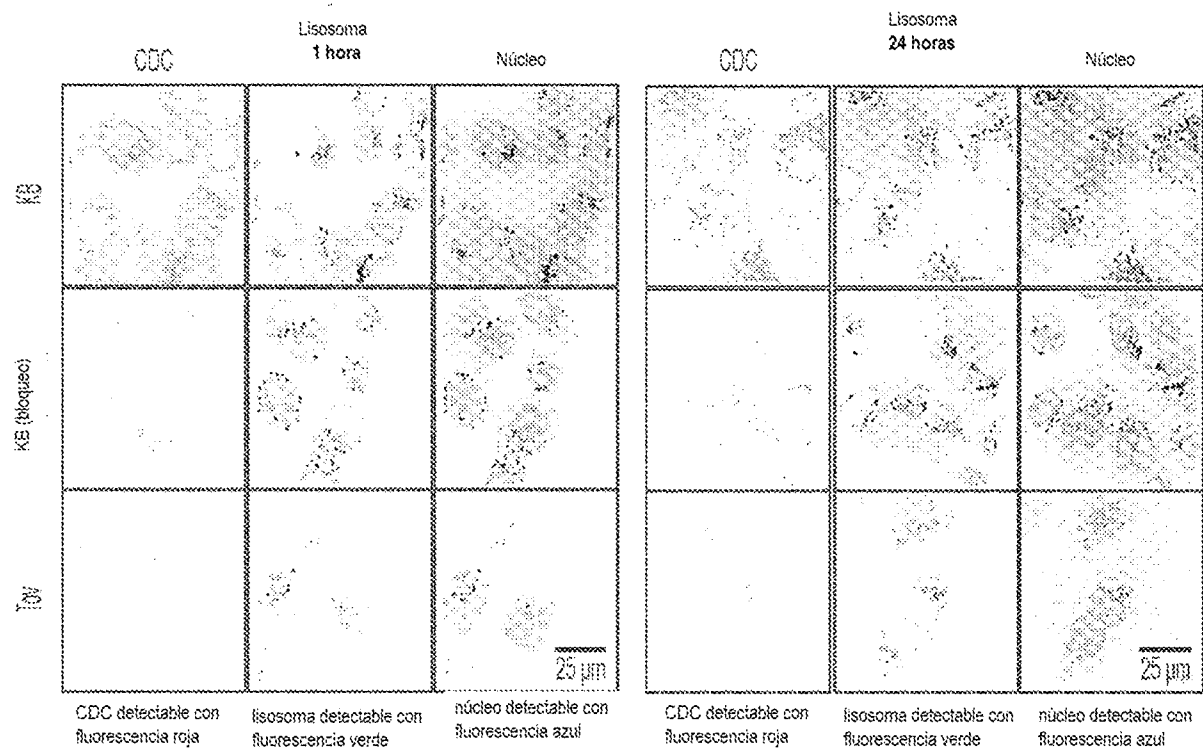


FIG. 17

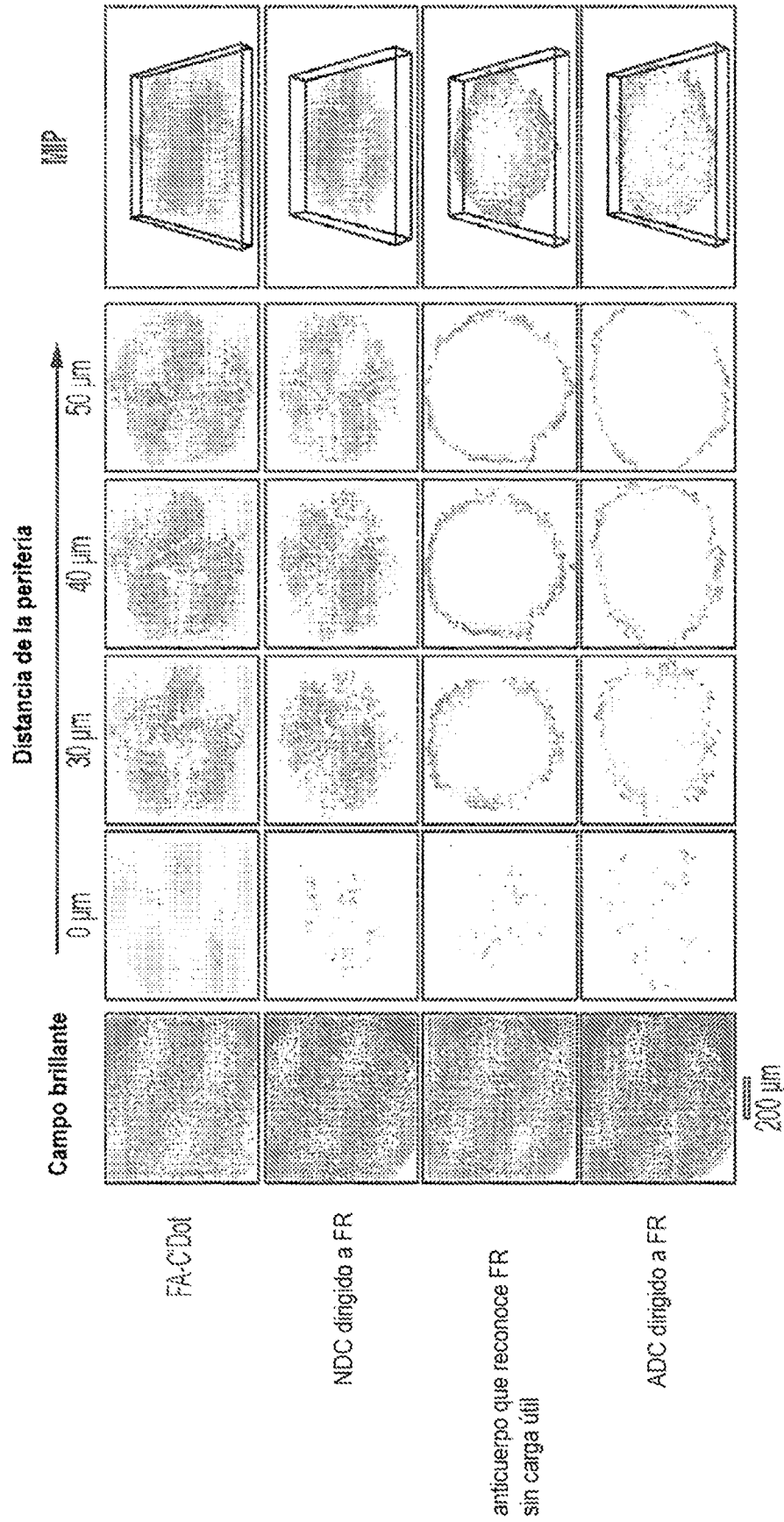


FIG. 18

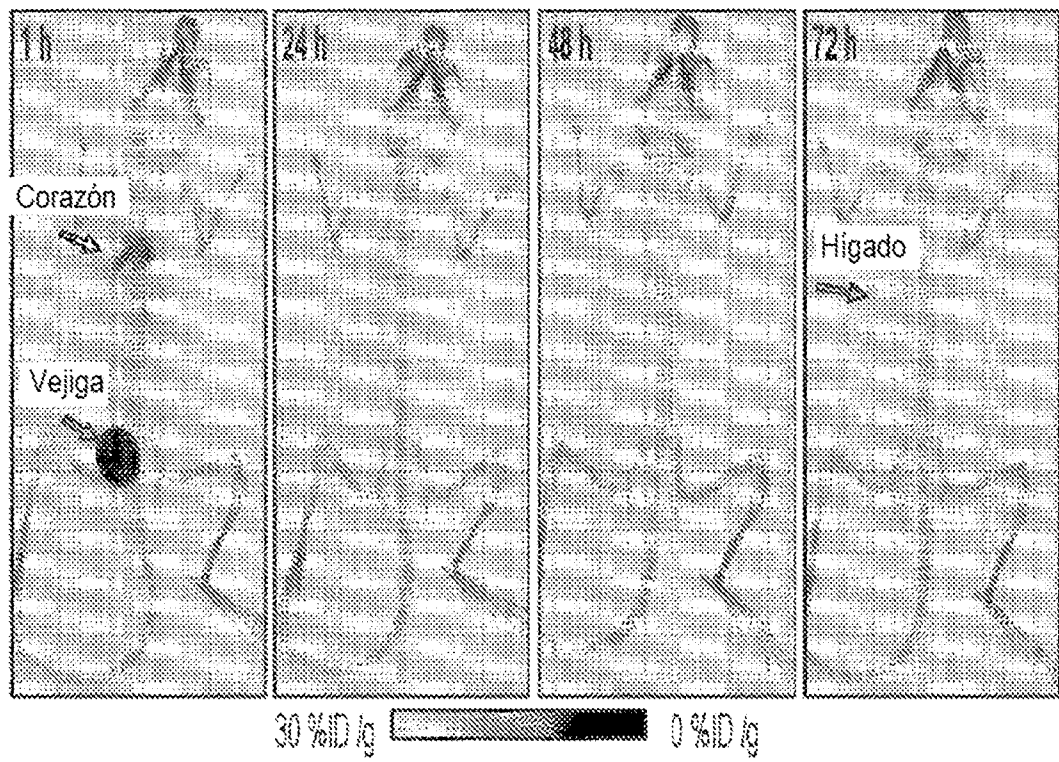


FIG. 19A

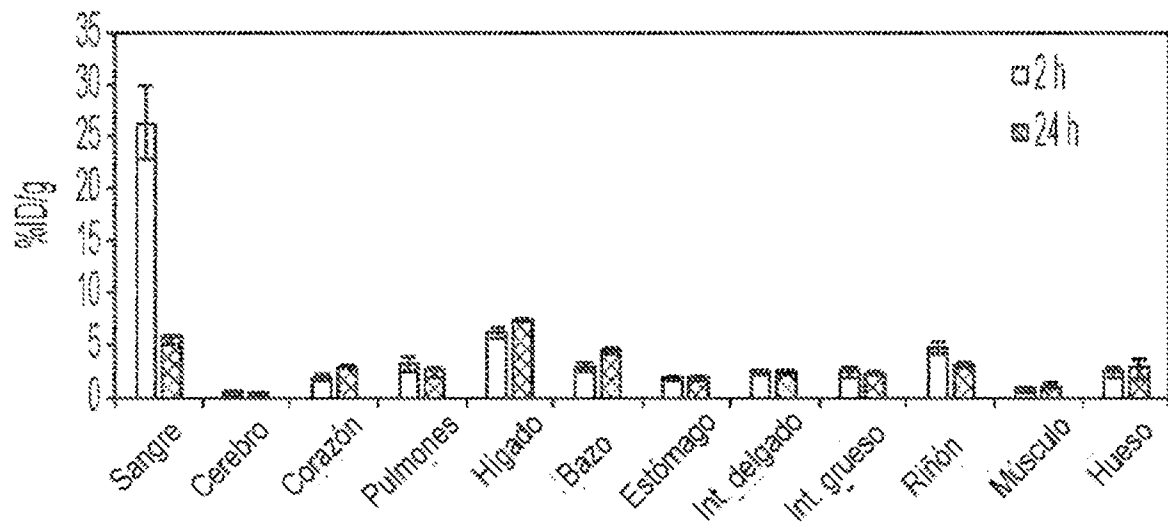


FIG. 19B

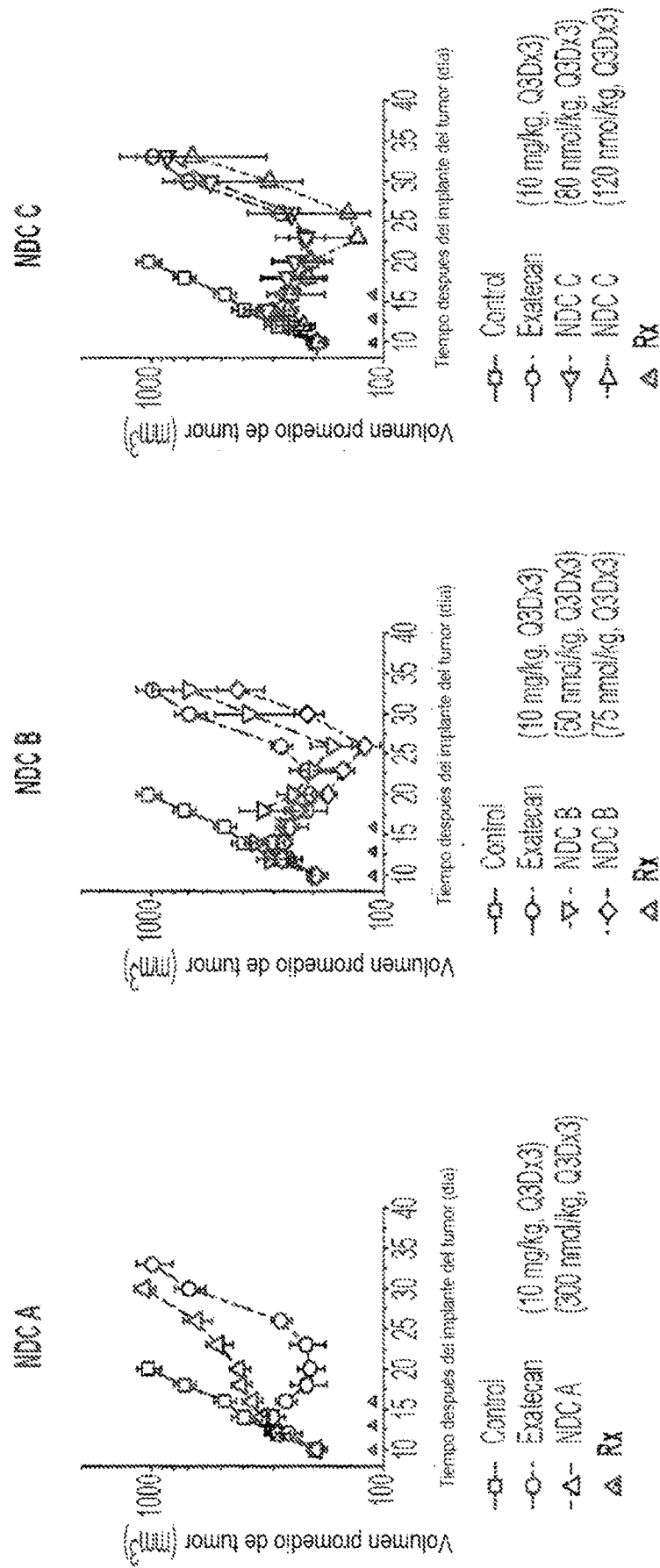


FIG. 20A

FIG. 20B

FIG. 20C

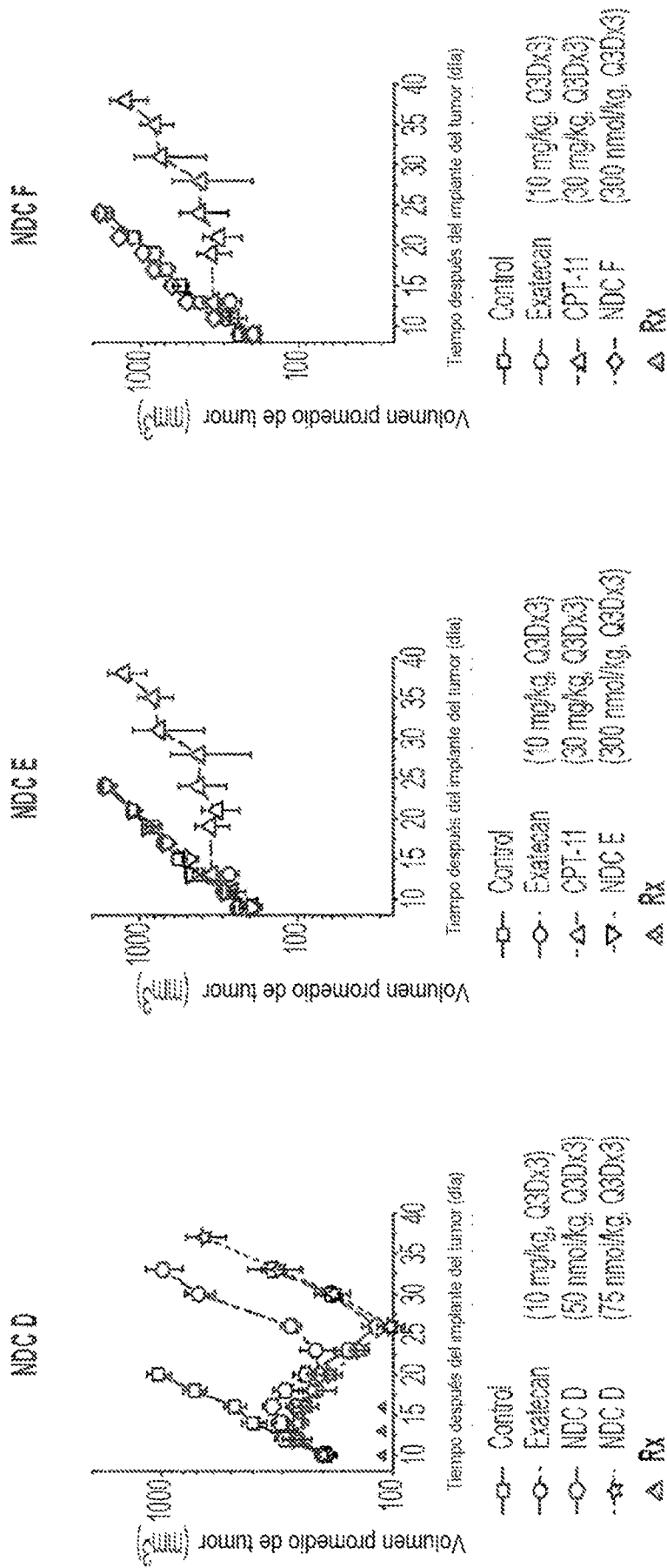


FIG. 20D

FIG. 20E

FIG. 20F

Irinotecan en KB resistente a Irino

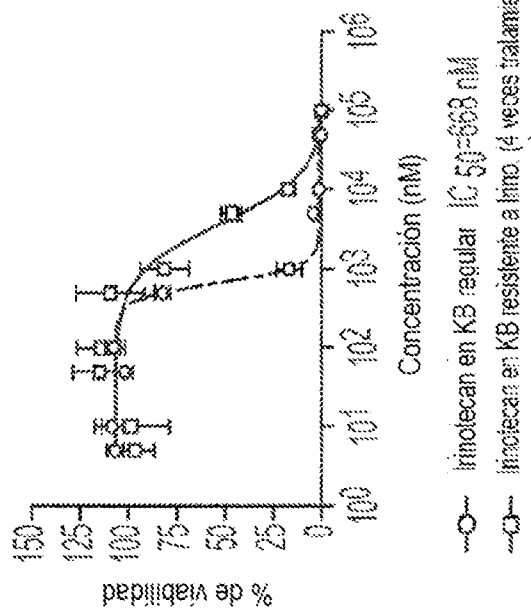


FIG. 21A

Potencia de FA-CDC en KB regular y resistente a Irino

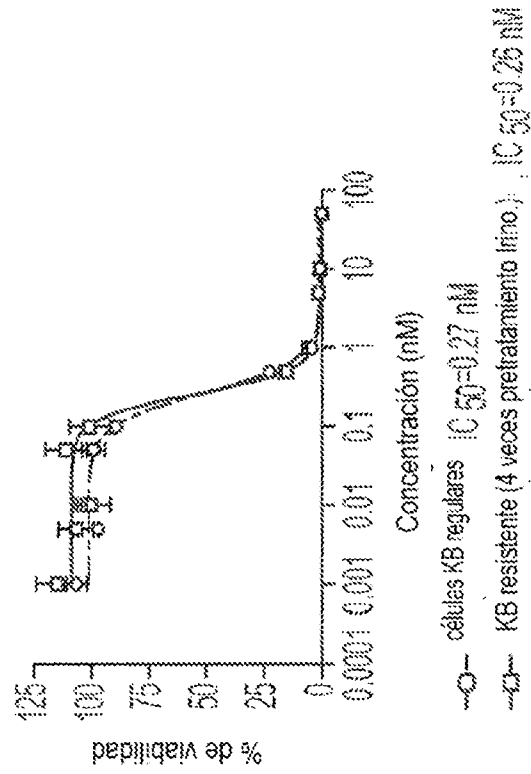
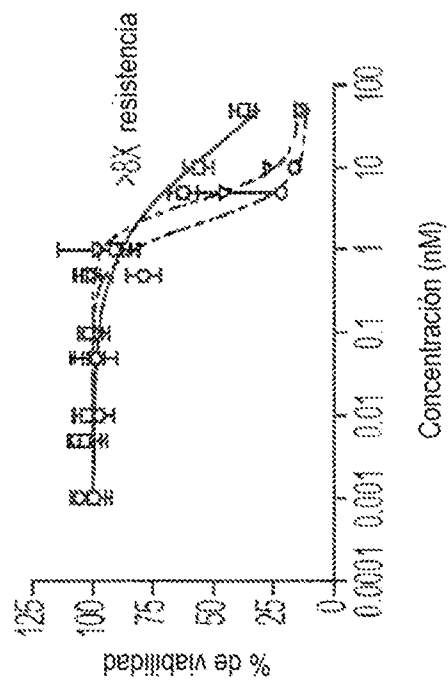


FIG. 21B

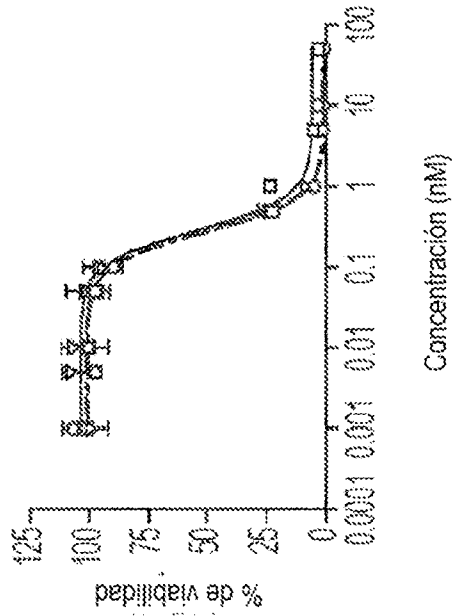
Potencia de Exatecán en KB regulares y resistentes



- Células KB regulares IC₅₀=2.0 nM
- ▽— KB resistente (4 veces pretratamiento con Exa.) IC₅₀=4.0 nM
- KB resistente (7 veces pretratamiento con Exa.) IC₅₀=16.9 nM

FIG. 22A

Potencia de FA-CDC en KB regulares y resistentes a Exa.



- Células KB regulares IC₅₀=0.27 nM
- ▽— KB resistente (4 veces pretratamiento con Exa.) IC₅₀=0.28 nM
- KB resistente (7 veces pretratamiento con Exa.) IC₅₀=0.30 nM

FIG. 22B

Exposición de 7 días (ensayo citotóxico CellTiter-Glo(R))							
Nombres de compuestos	DPR*	KE(++++)	IGROV-1(++)	SK-OV-3(++)	HCC827(++)	A549(-)	BT549(-)
FA-CDC	43	0.02 nM	0.10 nM	0.20 nM	0.2 nM	0.6 nM	0.1 nM
FA-CDC	20	0.23 nM	0.44 nM	0.70 nM	0.3 nM	1.9 nM	0.33 nM
FA-CDC	8	0.70 nM	0.63 nM	2.3 nM	0.6 nM	2.4 nM	0.62 nM
Exatecán libre	1	1.6 nM	0.84 nM	0.5 nM	0.6 nM	3.2 nM	0.4 nM

Exposición de 6 horas (ensayo citotóxico CellTiter-Glo(R))							
Nombres de compuestos	DPR*	KE(++++)	IGROV-1(++)	SK-OV-3(++)	HCC827(++)	A549(-)	BT549(-)
FA-CDC	43	2.0 nM	1.8 nM	2.7 nM	1.1 nM	6.1 nM	1.2 nM
FA-CDC	20	3.6 nM	6.2 nM	44.5 nM	2.7 nM	36.6 nM	4.4 nM
FA-CDC	8	6.0 nM	8.2 nM	50.7 nM	6.9 nM	49.5 nM	24.5 nM
Exatecán libre	1	74.4 nM	25.6 nM	55.8 nM	2.7 nM	39.7 nM	8.8 nM

*DPR: Relación de fármaco con respecto a partícula

FIG. 23

Histología	Modelo	Positividad FR alfa (puntuación IHC)	Citotoxicidad IC50 (nM)		Nº aumentos en potencia (diana vs libre)	
			NDC	Exatecan	NDC vs. Exatecan	Media
Ovario	ST004	3+	2.8	74.7	26.6	13.5
Ovario	ST3308	3+	1.8	7.7	4.4	
Ovario	ST024	3+	0.4	3.9	9.6	
Ovario	ST182B	2+	0.2	0.7	4.4	6.1
Ovario	ST206	2+	17.4	202.8	11.7	
Ovario	ST2442	2+	0.8	1.7	2.2	
Ovario	ST182	1+	0.3	2.8	8.5	4.3
Ovario	ST419	1+	0.16	0.34	2.1	
Ovario	ST4321	1+	0.3	0.7	2.4	
Ovario	ST2199	1+	-	-	-	-

Histology	Modelo	Positividad FR alfa (puntuación IHC)	Citotoxicidad IC50 (nM)		Nº aumentos en potencia (diana vs libre)	
			NDC	Exatecan	NDC vs. Exatecan	Mean
NSCL	ST1931	3+	0.25	2.13	8.5	7.9
NSCL	ST1989	3+	2.4	17.4	7.3	
NSCL	ST1243	2+	0.46	4.74	10.3	
NSCL	ST3847	2+	0.31	2.87	9.3	7.5
Mama (HR-, HER2+)	ST353	2+	1.69	5.79	3.4	
Mama (HR+, HER2+)	ST430	2+	0.42	1.58	3.8	
Mama (HR+, HER2+)	STF040	2+	3.18	33.64	10.6	66.6
TNBC	ST1248	1+	1.93	161.9	83.9	
TNBC	ST1599	1+	3.20	167.5	49.2	

Histología	Modelo	Positividad FR alfa (puntuación IHC)	Citotoxicidad IC50 (nM)		Nº aumentos en potencia (diana vs libre)	
			NDC	Exatecan	NDC vs. Exatecan	Media
Endometrio	ST1392	3+	0.39	3.44	8.8	10.2
Endometrio	ST2043	3+	36.6	409.5	11.2	
Endometrio	ST4413	3+	2.47	25.82	10.5	
Endometrio	ST2073	2+	3.15	7.9	2.5	9.4
Endometrio	ST2136	2+	6.13	21.4	3.5	
Endometrio	ST2846	2+	0.80	16.67	20.8	
Endometrio	ST1203	2+	0.22	2.29	10.4	9.4
Cabeza y cuello	ST2216	2+	1.21	9.74	8.0	
Cabeza y cuello	ST2430	2+	0.37	2.0	5.3	
NSCL	ST3898	2+	4.04	61.6	15.2	9.4

FIG. 24

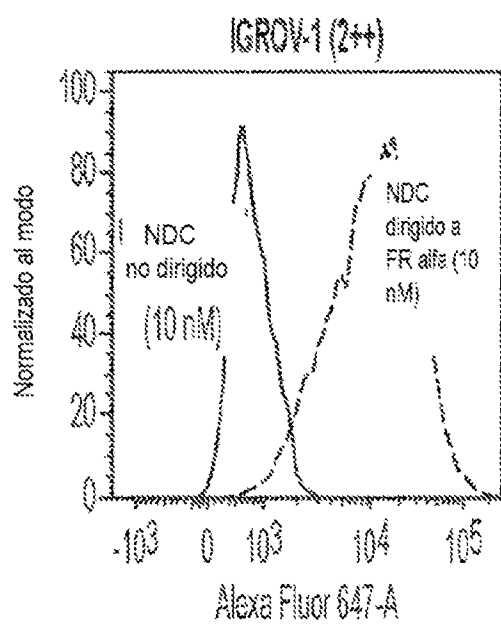


FIG. 25A

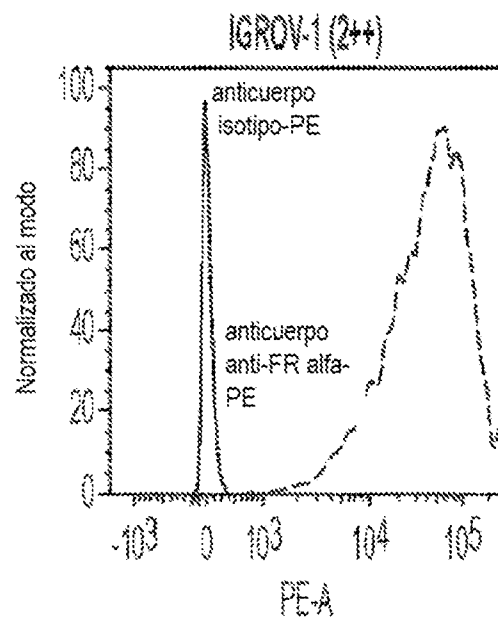


FIG. 25B

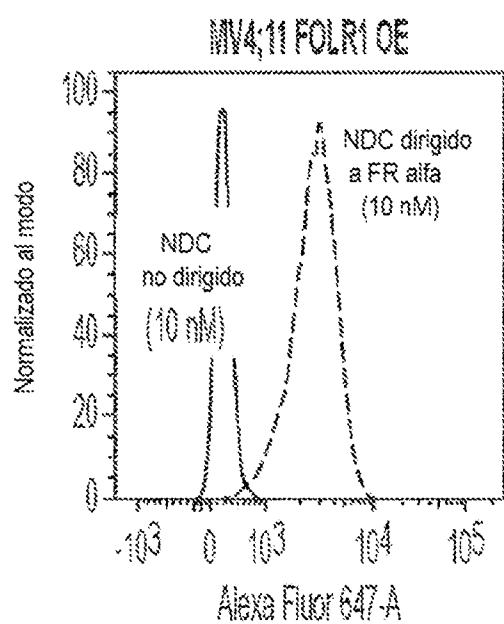


FIG. 25C

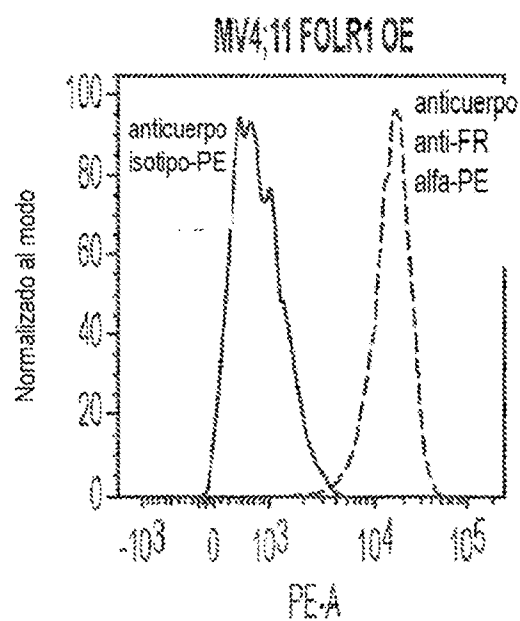


FIG. 25D

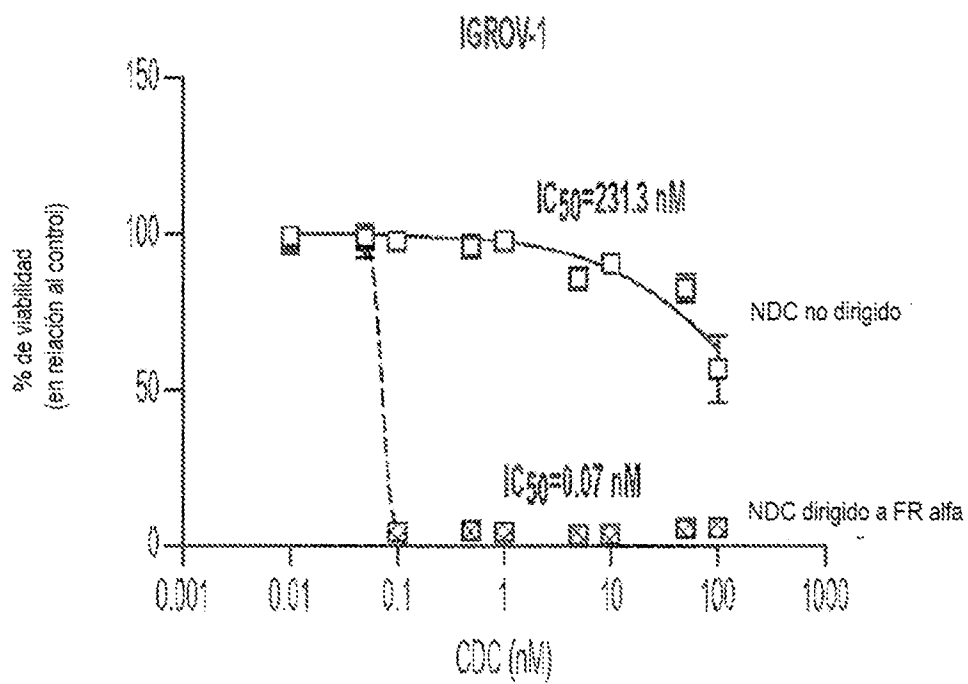


FIG. 26A

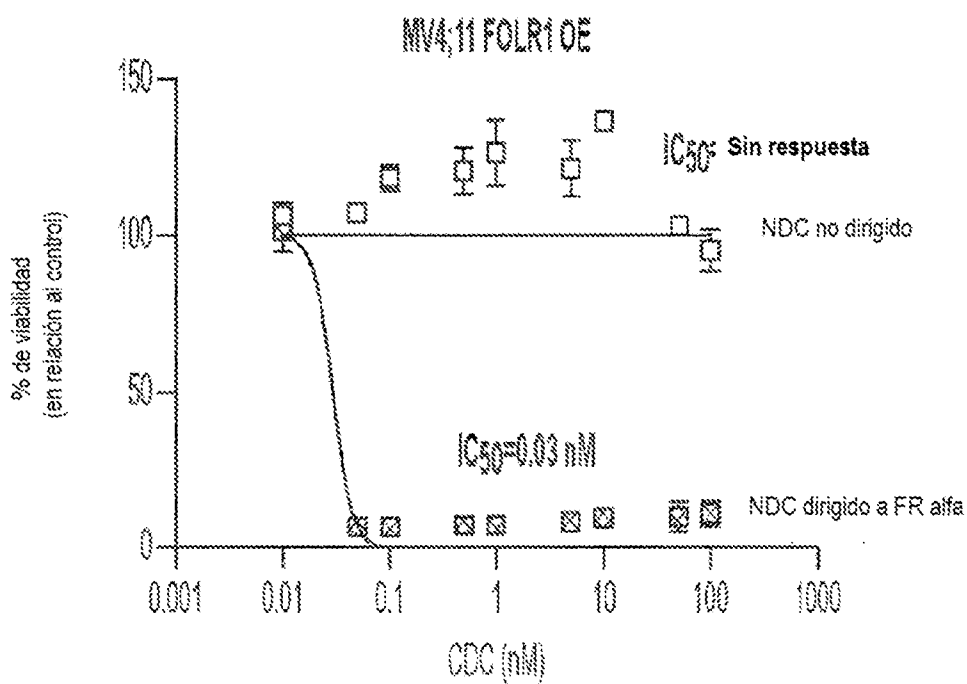


FIG. 26B

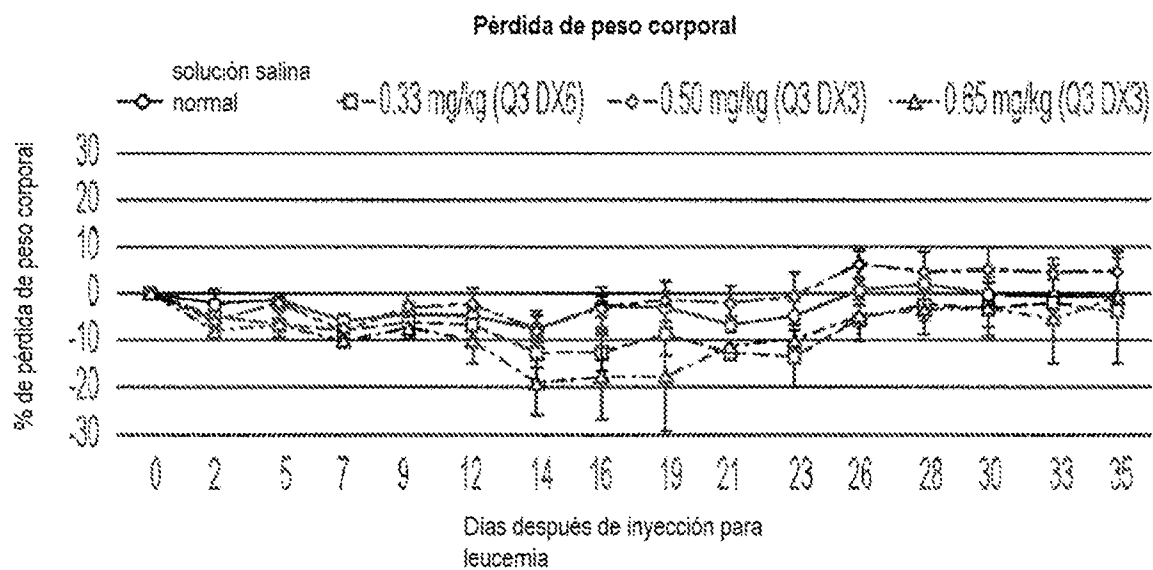


FIG. 27

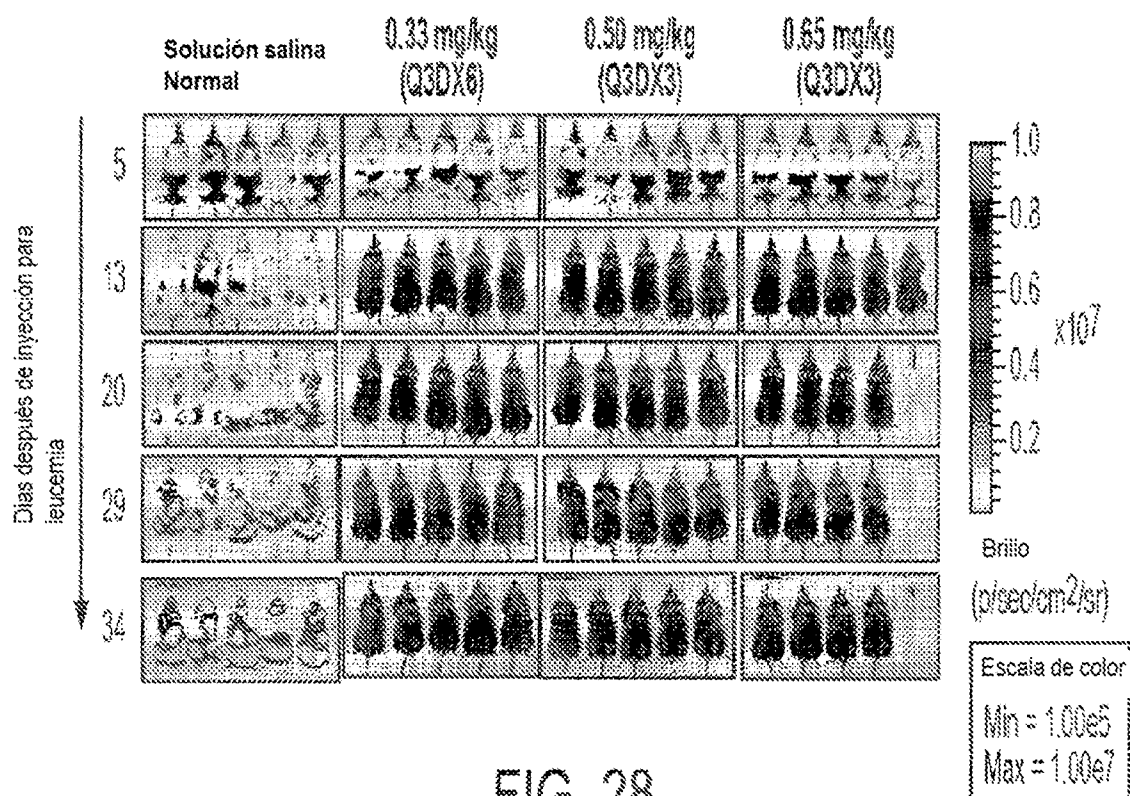


FIG. 28

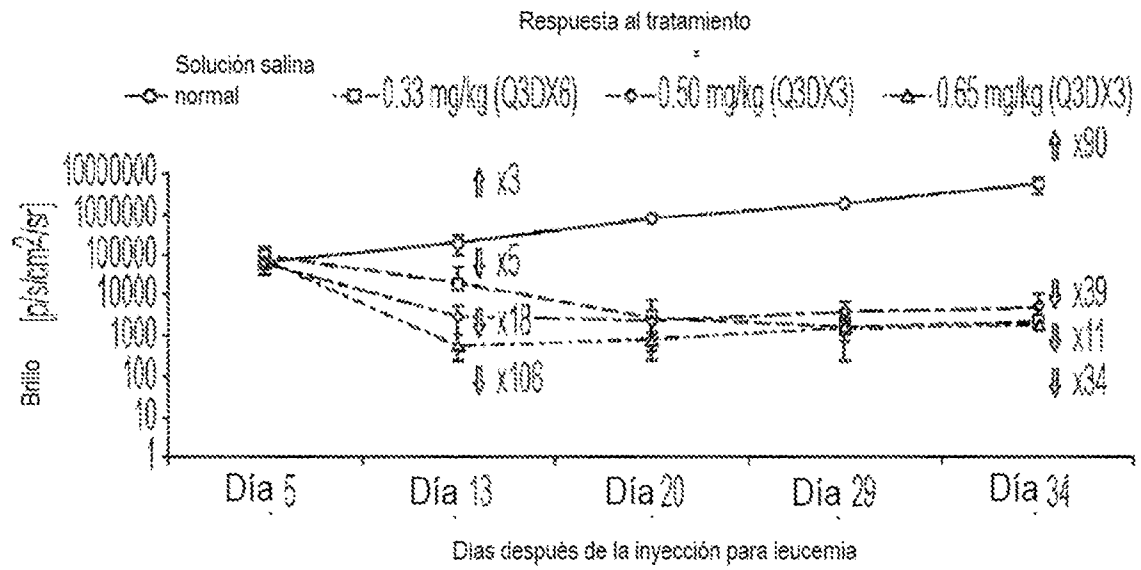


FIG. 29

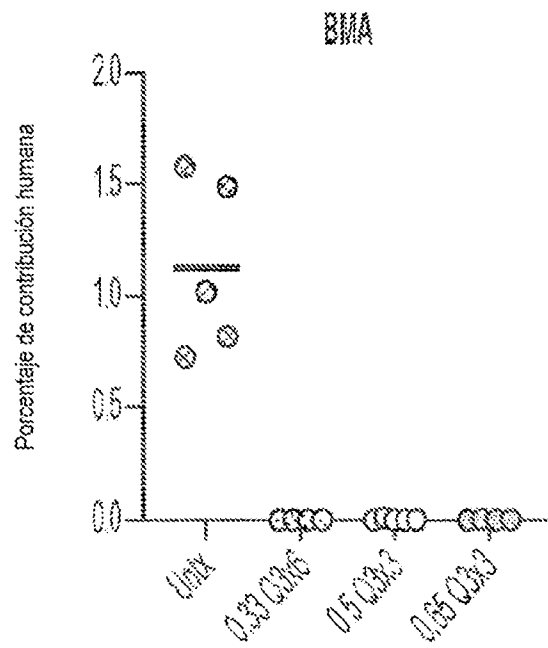


FIG. 30

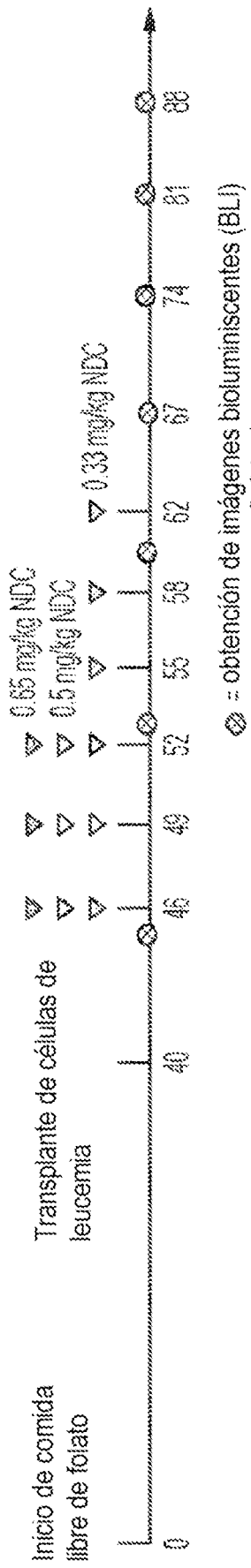


FIG. 31

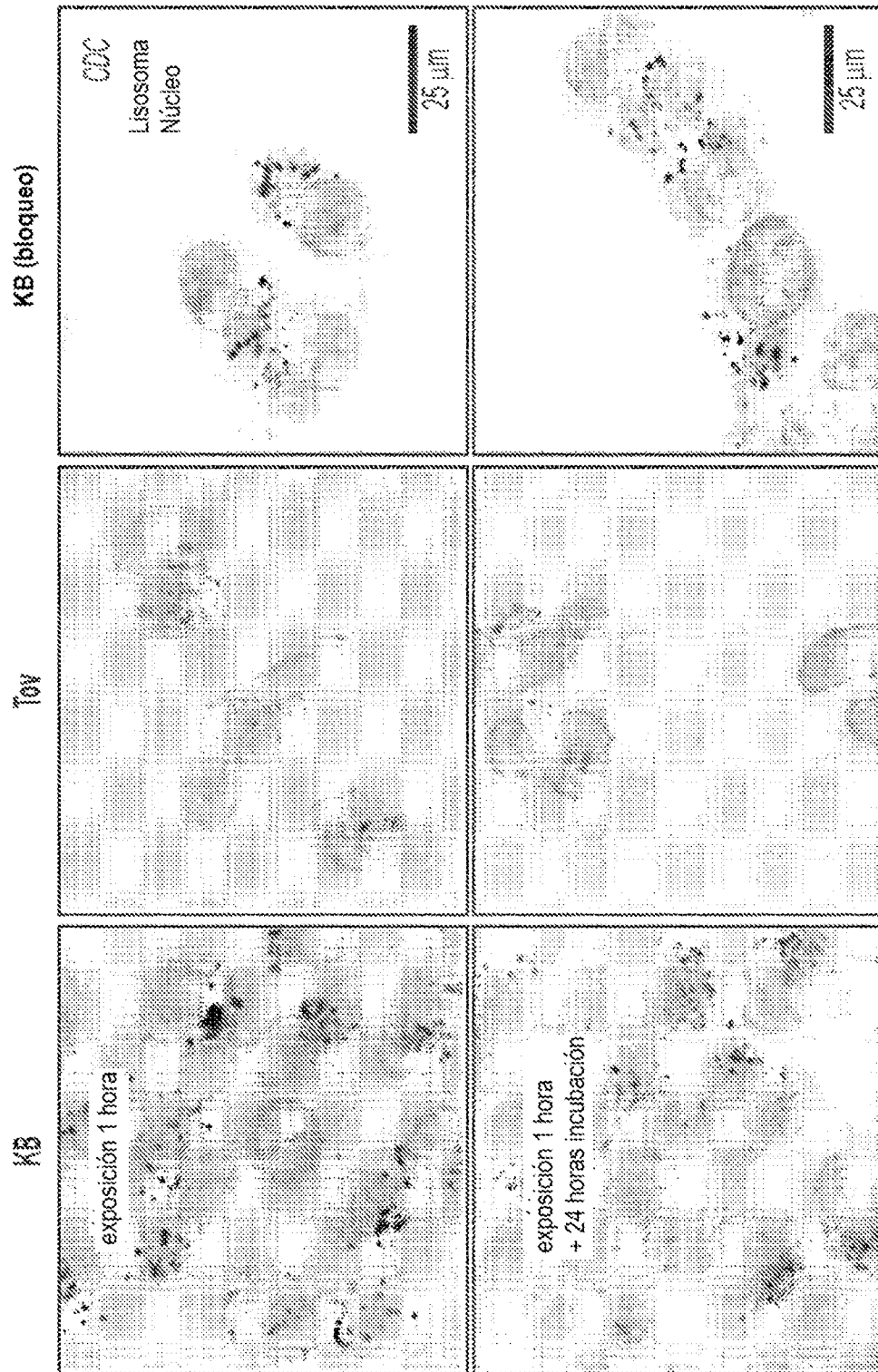


FIG. 32

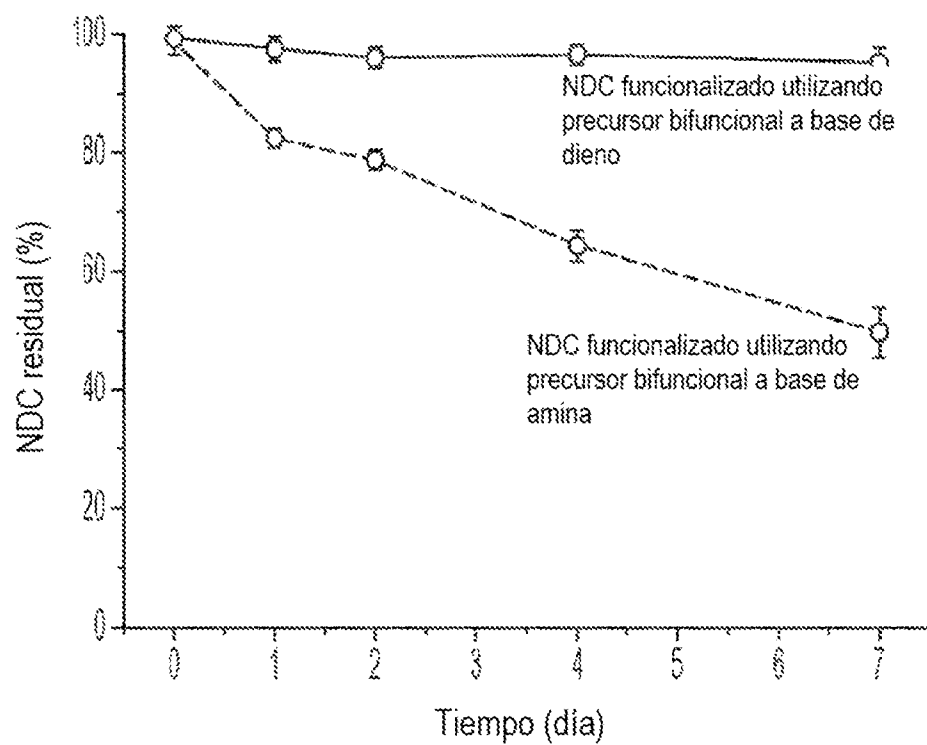


FIG. 33A

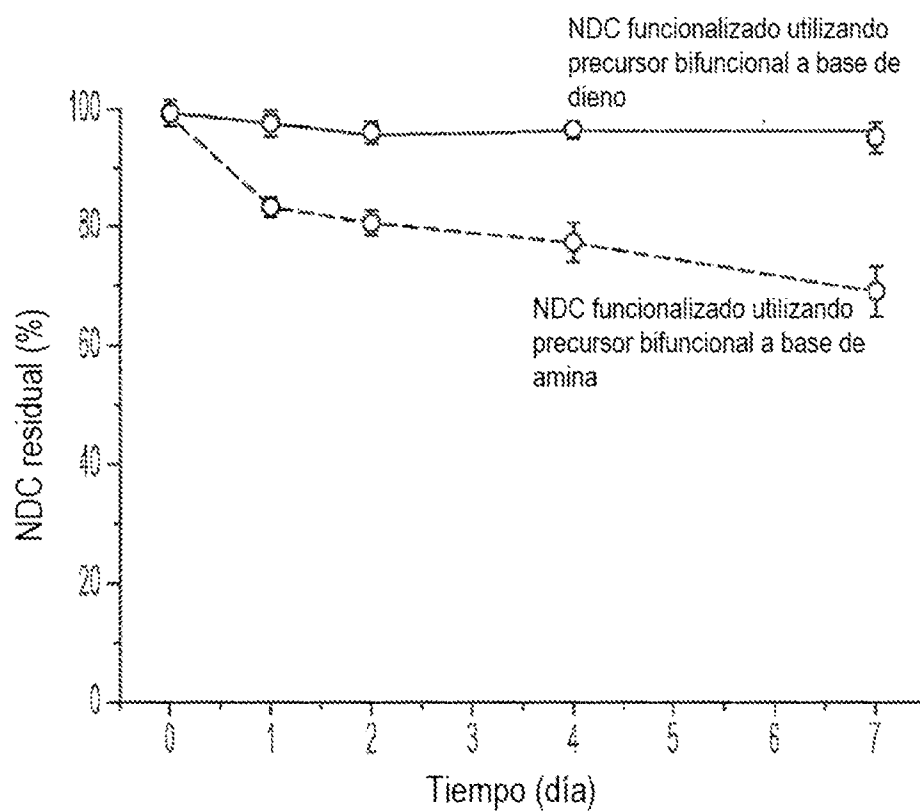


FIG. 33B