

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 001 186**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2019 PCT/GB2019/051741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.12.2019 WO19243833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2019 E 19734150 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024 EP 3810167**

54 Título: **Ligandos peptídicos bicíclicos específicos para Nectina-4**

30 Prioridad:

22.06.2018 GB 201810250

26.09.2018 GB 201815684

13.11.2018 GB 201818499

02.04.2019 GB 201904632

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2025

73 Titular/es:

**BICYCLETX LIMITED (100.00%)
Blocks A&B, Portway Building, Granta Park,
Great Abington
Cambridge CB21 6GS, GB**

72 Inventor/es:

**BESWICK, PAUL;
CHEN, LIUHONG;
MUDD, GEMMA ELIZABETH;
PARK, PETER;
VAN RIETSCHOTEN, KATERINE;
RIGBY, MICHAEL;
BLAKEMORE, STEPHEN;
GELB, TARA y
KEEN, NICHOLAS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 3 001 186 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

Ligandos peptídicos bicíclicos específicos para Nectina-4

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos que están unidos covalentemente a armazones moleculares de tal manera que se delimitan dos o más bucles peptídicos entre los puntos de unión al armazón. En particular, la invención describe péptidos que son proteínas de unión de alta afinidad de Nectina-4. La invención también incluye conjugados de fármacos que comprenden dichos péptidos, conjugados con uno o más grupos efectores y/o funcionales, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos ligandos peptídicos y conjugados de fármacos y al uso de dichos ligandos peptídicos y conjugados de fármacos en la prevención, la supresión o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por Nectina-4.

15 Antecedentes de la invención

Los péptidos cíclicos son capaces de unirse con alta afinidad y especificidad a dianas proteicas y, por lo tanto, son una clase de moléculas atractiva para el desarrollo de opciones terapéuticas. De hecho, varios péptidos cíclicos ya se usan con éxito en la clínica, como, por ejemplo, el péptido antibacteriano vancomicina, el fármaco inmunosupresor ciclosporina o el fármaco antineoplásico octreotida (Driggers *et al.* (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Las buenas propiedades de unión son resultado de una superficie de interacción relativamente grande formada entre el péptido y la diana así como de la flexibilidad conformacional reducida de las estructuras cíclicas. Normalmente, los macrociclos se unen a superficies de varios cientos de angstroms cuadrados, como, por ejemplo, el antagonista CXCR4 de péptido cíclico CVX15 (400 Å²; Wu *et al.* (2007), *Science* 330, 1066-71), un péptido cíclico con el motivo Arg-Gly-Asp que se une a la integrina αVβ3 (355 Å²) (Xiong *et al.* (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) o el inhibidor del péptido cíclico upaína-1 que se une al activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (603 Å²; Zhao *et al.* (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

Debido a su configuración cíclica, los macrociclos peptídicos son menos flexibles que los péptidos lineales, lo que conduce a una menor pérdida de entropía al unirse a las dianas y da como resultado una mayor afinidad de unión. La flexibilidad reducida también conduce al bloqueo de conformaciones específicas de la diana, lo que aumenta la especificidad de unión en comparación con los péptidos lineales. Este efecto se ha ejemplificado por un inhibidor potente y selectivo de la metaloproteínasa de matriz 8 (MMP-8) que perdió su selectividad sobre otras MMP cuando se abrió su anillo Cherney *et al.* (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). Las propiedades de unión favorables logradas a través de la macrociclación son incluso más pronunciadas en péptidos multicíclicos que tienen más de un anillo peptídico como, por ejemplo, en vancomicina, nisina y actinomicina.

Diferentes equipos de investigación han unido previamente polipéptidos con restos de cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp y McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). Meloen y sus colaboradores habían usado tris(bromometil)benceno y moléculas relacionadas para la ciclación rápida y cuantitativa de múltiples bucles peptídicos sobre armazones sintéticos para la imitación estructural de superficies de proteínas (Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). Los métodos para la generación de compuestos farmacológicos candidatos en donde dichos compuestos se generan mediante la unión de polipéptidos que contienen cisteína a un armazón molecular como, por ejemplo, TATA (1,1',1''-(1,3,5-triazinano-1,3,5-triil)triprop-2-en-1-ona, Heinis *et al.* *Angew Chem, Int Ed.* 2014; 53:1602-1606).

Se han desarrollado enfoques combinatorios basados en la presentación en fagos para generar y cribar grandes bibliotecas de péptidos bicíclicos para dianas de interés (Heinis *et al.* (2009), *Nat Chem Biol* 5 (7), 502-7 y el documento WO 2009/098450). Brevemente, se presentaron en fago bibliotecas combinatorias de péptidos lineales que contenían tres restos de cisteína y dos regiones de seis aminoácidos aleatorios (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) y se ciclaron uniendo covalentemente las cadenas laterales de cisteína con un armazón de molécula pequeña. Chen *et al.* (2014) *Angewandte Chemie* 53(6), 1602-1606 desvelan ligandos peptídicos estabilizados por moléculas pequeñas. El documento WO 2016/067035 desvela polipéptidos que están unidos covalentemente a armazones moleculares de tal manera que se delimitan dos o más bucles peptídicos entre los puntos de unión al armazón, en particular, péptidos que son aglutinantes de alta afinidad de la metaloproteasa de membrana tipo 1 (MT1-MMP).

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un ligando peptídico específico para Nectina-4 que comprende un polipéptido que comprende al menos tres restos de cisteína, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un armazón molecular que forma enlaces covalentes con los restos de cisteína del polipéptido de tal manera que se formen al menos dos bucles de polipéptido en el armazón molecular, en donde el ligando peptídico comprende la secuencia de aminoácidos:

C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; en donde 1Nal representa 1-naftilalanina, HArg representa homoarginina, HyP representa hidroxiprolina y C_i, C_{ii} y C_{iii} representan primer, segundo y tercer restos de cisteína, respectivamente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco que comprende un ligando peptídico como se define en el presente documento conjugado con uno o más grupos efectores y/o funcionales.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ligando peptídico o un fármaco como se define en el presente documento junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco como se define en el presente documento para su uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por Nectina-4.

- 15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco como se define en el presente documento para su uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de cáncer en un paciente identificado que tiene una variación del número de copias (CNV) aumentada de Nectina-4.

Breve descripción de las figuras

Cuando están presentes en las figuras, las barras de error representan el error típico de la media (SEM).

- 20 **Figuras 1 y 2:** Trazos del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos BALB/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H292.
- Figuras 3 y 4:** Trazos del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones CB17-SCID hembra portadores del xenoinjerto HT-1376.
- 25 **Figura 5:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto Panc2.13.
- Figura 6:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468.
- 30 **Figura 7:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8549 (con BCY8245 como control), a ratones desnudos BALB/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H292.
- Figura 8:** Estrategia de selección para Nectina-4 en mama (T-47D y MDA-MB-468).
- Figura 9:** Estrategia de selección para Nectina-4 en NCI-H292 y NCI-H322.
- Figuras 10 y 11:** Estrategia de selección para Nectina-4 en NCI-H526 y HT1080, respectivamente.
- 35 **Figuras 12-16:** Estrategia de selección para Nectina-4 En **cáncer de vejiga** (HT1376; Figura 12), **cáncer de mama** (MDA-MB-468; Figura 13), **cáncer colorrectal** (HT-29; Figura 14A y HCT-116; Figura 14B), **cáncer de pulmón** (A549; Figura 15A, NCI-H292; Figura 15B, NCI-H358; Figura 15C y NCI-526; Figura 15D) y **cáncer de páncreas** (Panc02.13; Figura 16), respectivamente.
- Figura 17:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto A549.
- 40 **Figura 18:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto HCT116.
- Figura 19:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones CB17-SCID hembra portadores del xenoinjerto HT-1376.
- 45 **Figura 20:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468.
- Figura 21:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H292.
- Figura 22:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H526.
- 50 **Figura 23:** Trazo del volumen tumoral después de administrar BCY8245 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto Panc2.13.
- Figura 24:** Trazos del volumen tumoral después de administrar BCY8245 o BCY8245 en combinación con BCY8234 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468.
- 55 **Figura 25:** Trazos del volumen tumoral después de administrar BCY8245 solo o BCY8245 en combinación con BCY8234 a ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468.
- Figuras 26-31:** Trazos de volumen tumoral en xenoinjertos Lu-01-0412, LU-01-0007, CTG-1771, CTG-1171, PDX CTG-1106 y CTG-0896.
- Figura 32:** La eficacia de BT8009 (es decir, BCY8245) se correlaciona con la expresión de xenoinjertos CDX/PDX. Los xenoinjertos con poca o ninguna expresión de Nectina-4 muestran una tasa de crecimiento tumoral reducida. Los xenoinjertos que expresan Nectina-4 muestran regresiones del tumor. En este análisis se incluyen ambos modelos PDX y CDX, los valores se recopilan de diversos informes.
- 60 **Figura 33:** Las células MDA-MB-468 expresan Nectina-4 y muestran una retención prolongada de MMAE en el tumor.
- Figura 34:** HCS: Análisis de datos de la línea celular MDA-MB-468.
- 65

Descripción detallada de la invención

En una realización, el ligando peptídico de C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 5 [B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8234);
 Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122);
 Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126);
 (SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8116);
 Fluoresceína-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8205); y
 10 [PYA][B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8846).

En una realización adicional, el ligando peptídico de C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 15 [B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8234);
 Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122);
 Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126);
 (SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8116); y
 20 Fluoresceína-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8205).

En una realización adicional más, el ligando peptídico de C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 25 Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122);
 Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126); y
 (SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8116).

Los datos se presentan en el presente documento en la Tabla 2 que demuestra que los ligandos peptídicos de esta realización exhibieron excelentes niveles de unión a la Nectina-4 humana como se evidencia por los datos de unión de SPR.

En una realización adicional más, el ligando peptídico de C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 35 Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122); y
 Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126).

Los datos se presentan en el presente documento en la Tabla 1 que demuestra que los ligandos peptídicos de esta realización exhibieron excelentes niveles de unión a la Nectina-4 humana como se evidencia por los datos de unión de competición.

En una realización adicional más, el ligando peptídico de C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 45 [B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8234).
 Los datos se presentan en el presente documento en la Tabla 3 que demuestra que los ligandos peptídicos de esta realización cuando se conjugaron con un agente citotóxico exhibieron excelentes niveles de unión (< 10 nM) a la Nectina-4 humana como se evidencia por los datos de unión de SPR.

En una realización, el armazón molecular es 1,1',1''-(1,3,5-triazinano-1,3,5-triil)triprop-2-en-1-ona (TATA).

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la materia, tal como en las técnicas de la química de péptidos, cultivo celular y presentación en fagos, química de ácidos nucleicos y bioquímica. Se usan técnicas convencionales para biología molecular, métodos genéticos y bioquímicos (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc.).

Nomenclatura

Numeración

Cuando se hace referencia a las posiciones de los restos de aminoácidos dentro de los péptidos de la invención, los restos de cisteína (C_i, C_{ii} y C_{iii}) se omiten de la numeración porque son invariantes, por lo tanto, la numeración de los restos de aminoácidos dentro de los péptidos de la invención se menciona como a continuación:

- 65 C_i-P₁-[1Nal]₂-[dD]₃-C_{ii}-M₄-[HArg]₅-D₆-W₇-S₈-T₉-P₁₀-[HyP]₁₁-W₁₂-C_{iii} (SEQ ID NO: 1)

Para los fines de esta descripción, se supone que todos los péptidos bicíclicos están ciclados con 1,1',1''-(1,3,5-triazinan-1,3,5-triil)triprop-2-an-1-ona (TATA) y producen una estructura tri-sustituida. La ciclación con TATA se produce en C_i, C_{ii} y C_{iii}.

5 Formato molecular

Las extensiones en el extremo N o C de la secuencia central bicíclica se añaden al lado izquierdo o derecho de la secuencia, separadas por un guion. Por ejemplo, una cola βAla-Sar10-Ala N-terminal se denotaría como: βAla-Sar10-A-(SEQ ID NO: X).

10 Secuencias peptídicas invertidas

A la luz de la divulgación en Nair et al (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373, se prevé que las secuencias peptídicas divulgadas en el presente documento también encuentren utilidad en su forma retroinversa. Por ejemplo, la secuencia se invierte (es decir, el extremo N se convierte en el extremo C, y viceversa) y su estereoquímica también se invierte (es decir, los aminoácidos D se convierten en aminoácidos L, y viceversa).

Ligandos peptídicos

20 Un ligando peptídico, como se denomina en el presente documento, se refiere a un péptido unido covalentemente a un armazón molecular. Normalmente, tales péptidos comprenden dos o más grupos reactivos (es decir, restos de cisteína) que son capaces de formar enlaces covalentes con el armazón, y una secuencia delimitada entre dichos grupos reactivos que se denomina secuencia de bucle, ya que forma un bucle cuando el péptido se une al armazón. En el presente caso, los péptidos comprenden al menos tres restos de cisteína (denominados en el presente documento C_i, C_{ii} y C_{iii}) y forman al menos dos bucles en el armazón.

Ventajas de los ligandos peptídicos

30 Determinados péptidos bicíclicos de la presente invención tienen una serie de propiedades ventajosas que les permiten ser considerados como moléculas similares a fármacos adecuadas para inyección, inhalación, administración nasal, ocular, oral o tópica. Dichas propiedades ventajosas incluyen:

- Reactividad cruzada entre especies. Este es un requisito típico para la farmacodinámica preclínica y la evaluación farmacocinética;
- Estabilidad a las proteasas. Los ligandos peptídicos bicíclicos deberían demostrar idealmente estabilidad a proteasas plasmáticas, proteasas epiteliales ("ancladas a la membrana"), proteasas gástricas e intestinales, proteasas de la superficie pulmonar, proteasas intracelulares y similares. La estabilidad a proteasa debe mantenerse entre diferentes especies de tal manera que pueda desarrollarse un candidato líder bicíclico en modelos animales así como administrarlo con confianza a seres humanos;
- Perfil de solubilidad deseable. Esto va en función de la proporción de restos cargados e hidrófilos frente a hidrófobos y de enlaces de H intra/intermoleculares, que es importante para fines de formulación y absorción;
- Una semivida en plasma óptima en la circulación. Dependiendo de la indicación clínica y del régimen de tratamiento, puede ser necesario desarrollar un péptido bicíclico para una exposición breve en un entorno de manejo de enfermedades agudas, o desarrollar un péptido bicíclico con una retención mejorada en la circulación y, por lo tanto, sea óptimo para el manejo de cuadros clínicos más crónicos. Otros factores que determinan la semivida en plasma deseable son los requisitos de exposición sostenida para una máxima eficiencia terapéutica frente a la toxicología acompañante debido a la exposición sostenida al agente; y
- Selectividad. Determinados ligandos peptídicos de la invención demuestran una buena selectividad sobre otras nectinas.

55 **Sales farmacéuticamente aceptables**

Se apreciará que las formas salinas están dentro del alcance de esta invención y las referencias a ligandos peptídicos incluyen las formas salinas de dichos ligandos.

60 Las sales de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales tales como los métodos descritos en Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editora), ISBN: 3-90639-026-8, tapa dura, 388 páginas, agosto de 2002. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos.

Las sales de adición de ácido (monosales o disales) pueden formarse con una amplia diversidad de ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen mono o di-sales formadas con un ácido seleccionado del grupo que consiste en acético, 2,2-dicloroacético, adípico, algínico, ascórbico (por ejemplo, L-ascórbico), L-aspartico, bencenosulfónico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+) alcanfórico, alcanfor-sulfónico, (+)-(1S)-alcanfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfúrico, etano-1,2-disulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, glucoheptónico, D-glucónico, glucurónico (por ejemplo, D-glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutarico, glicólico, hipúrico, ácidos hidroalílicos (por ejemplo, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico), isetiónico, láctico (por ejemplo, (+)-L-láctico, ($\pm$)-DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, ($\pm$)-DL-mandélico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, 1-hidroxi-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, pirúvico, L-piroglutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, (+)-L-tartárico, tiocianico, p-toluenosulfónico, ácidos undecilénico y valérico, así como aminoácidos acilados y resinas de intercambio catiónico.

Un grupo particular de sales consiste en sales formadas a partir de ácidos acético, clorhídrico, yodhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, sulfúrico, metanosulfónico (mesilato), etanosulfónico, naftalenosulfónico, valérico, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico y lactobiónico. Una sal particular es la sal de clorhidrato. Otra sal particular es la sal de acetato.

Si el compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, $-\text{COOH}$ puede ser $-\text{COO}^-$), entonces puede formarse una sal con una base orgánica o inorgánica, generando un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones de metales alcalinos tales como Li^+ , Na^+ y K^+ , cationes de metales alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tales como Al^{3+} o Zn^{2+} . Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ion amonio (es decir, NH_4^+) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Algunos ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: metilamina, etilamina, dietilamina, propilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Cuando los péptidos de la invención contienen una función amina, estos pueden formar sales de amonio cuaternario, por ejemplo, mediante reacción con un agente alquilante de acuerdo con métodos bien conocidos por el experto en la materia. Dichos compuestos de amonio cuaternario están dentro del alcance de la invención.

Derivados modificados

Se apreciará que los derivados modificados de los ligandos peptídicos como se definen en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos de dichos derivados modificados adecuados incluyen una o más modificaciones seleccionadas de: modificaciones N-terminales y/o C-terminales; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos por uno o más restos de aminoácidos no naturales (tal como el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos polares por uno o más aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos no polares con otros aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos no naturales); adición de un grupo espaciador; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos sensibles a la oxidación por uno o más restos de aminoácidos resistentes a la oxidación; sustitución de uno o más restos de aminoácidos por una alanina, reemplazo de uno o más restos de aminoácidos L por uno o más restos de aminoácidos D; N-alkilación de uno o más enlaces amida dentro del ligando peptídico bicíclico; reemplazo de uno o más enlaces peptídicos por un enlace sustituto; modificación de la longitud de la cadena principal del péptido; sustitución del hidrógeno en el carbono alfa de uno o más restos de aminoácidos con otro grupo químico, modificación de aminoácidos tales como cisteína, lisina, glutamato/aspartato y tirosina con reactivos amina, tiol, ácido carboxílico y fenol reactivo adecuados para funcionalizar dichos aminoácidos, e introducción o sustitución de aminoácidos que introduzcan reactividades ortogonales adecuadas para la funcionalización, por ejemplo, aminoácidos que portan grupos azida o alquino que permiten la funcionalización con restos fracciones que portan alquino o azida, respectivamente.

En una realización, el derivado modificado comprende una modificación N-terminal y/o C-terminal. En una realización adicional, en donde el derivado modificado comprende una modificación N-terminal usando una química amino-reactiva adecuada, y/o una modificación C-terminal usando una química carboxi-reactiva adecuada. En una realización adicional, dicha modificación N-terminal o C-terminal comprende la adición de un grupo efector, incluyendo pero no limitado a un agente citotóxico, un radioquelante o un cromóforo.

En una realización adicional, el derivado modificado comprende una modificación N-terminal. En una realización adicional, la modificación N-terminal comprende un grupo acetilo N-terminal. En esta realización, el grupo cisteína N-terminal (el grupo denominado en el presente documento C_i) se protege con caperuza con anhídrido acético u otros reactivos apropiados durante la síntesis de péptidos dando lugar a una molécula acetilada N-terminalmente. Esta realización proporciona la ventaja de eliminar un punto de reconocimiento potencial para aminopeptidasas y evita el potencial de degradación del péptido bicíclico.

En una realización alternativa, la modificación N-terminal comprende la adición de un grupo espaciador molecular que facilita la conjugación de grupos efectores y la retención de la potencia del péptido bicíclico con su diana.

En una realización adicional, el derivado modificado comprende una modificación en el extremo C. En una realización adicional, la modificación en el extremo C comprende un grupo amida. En esta realización, el grupo cisteína C-terminal (el grupo denominado en el presente documento C_{iii}) se sintetiza como una amida durante la síntesis de péptidos dando lugar a una molécula amidada C-terminalmente. Esta realización proporciona la ventaja de eliminar un punto de reconocimiento potencial para la carboxipeptidasa y reduce el potencial de degradación proteolítica del péptido bicíclico.

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos por uno o más restos de aminoácidos no naturales. En esta realización, pueden seleccionarse aminoácidos no naturales que tengan cadenas laterales isostéricas/isoeléctricas que no sean reconocidas por proteasas degradativas ni tengan ningún efecto adverso sobre la potencia de la diana.

Como alternativa, pueden usarse aminoácidos no naturales que tengan cadenas laterales de aminoácidos restringidas, de tal manera que la hidrólisis proteolítica del enlace peptídico cercano se impida conformacional y estéricamente. En particular, estos se refieren a análogos de prolina, cadenas laterales voluminosas, derivados disustituidos en C α (por ejemplo, ácido aminoisobutírico, Aib) y aminoácidos cíclicos, siendo un derivado simple el ácido aminociclopropilcarboxílico.

En una realización, el derivado modificado comprende la adición de un grupo espaciador. En una realización adicional, el derivado modificado comprende la adición de un grupo espaciador a la cisteína N-terminal (C_i) y/o la cisteína C-terminal (C_{iii}).

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos sensibles a la oxidación por uno o más restos de aminoácidos resistentes a la oxidación.

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos cargados por uno o más restos de aminoácidos hidrófobos. En una realización alternativa, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos hidrófobos por uno o más restos de aminoácidos cargados. El equilibrio correcto de restos de aminoácidos cargados frente a hidrófobos es una característica importante de los ligandos peptídicos bicíclicos. Por ejemplo, los restos de aminoácidos hidrófobos influyen en el grado de unión a proteínas plasmáticas y, por lo tanto, en la concentración de la fracción libre disponible en el plasma, mientras que los restos de aminoácidos cargados (en particular, arginina) pueden influir en la interacción del péptido con las membranas de fosfolípidos en las superficies celulares. Los dos en combinación pueden influir en la semivida, el volumen de distribución y la exposición del fármaco peptídico y pueden adaptarse de acuerdo con el criterio de valoración clínico. Además, la combinación y el número correctos de restos de aminoácidos cargados frente a hidrófobos pueden reducir la irritación en el lugar de inyección (si el fármaco peptídico se ha administrado por vía subcutánea).

En una realización, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos L por uno o más restos de aminoácidos D. Se cree que esta realización aumenta la estabilidad proteolítica por impedimento estérico y por una propensión de los D-aminoácidos a estabilizar las conformaciones de giro β (Tugyi et al (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

En una realización, el derivado modificado comprende la eliminación de cualquier resto de aminoácido y la sustitución por alaninas. Esta realización proporciona la ventaja de eliminar posibles sitio o sitios de ataque proteolítico.

Cabe señalar que cada una de las modificaciones mencionadas anteriormente sirve para mejorar deliberadamente la potencia o la estabilidad del péptido. Pueden lograrse mejoras de potencia adicionales basadas en modificaciones a través de los siguientes mecanismos:

- Incorporar restos hidrófobos que aprovechen el efecto hidrófobo y conduzcan a tasas de desactivación más bajas, de tal manera que se logren afinidades más altas;
- Incorporar grupos cargados que aprovechen interacciones iónicas de largo alcance, lo que conduce a tasas de activación más rápidas y a afinidades más altas (véase, por ejemplo, Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); e
- Incorporar restricciones adicionales en el péptido, por ejemplo, restringiendo las cadenas laterales de aminoácidos correctamente de tal manera que la pérdida de entropía sea mínima tras la unión a la diana, restringiendo los ángulos de torsión de la cadena principal de tal manera que la pérdida de entropía sea mínima tras la unión a la diana e introduciendo ciclaciones adicionales en la molécula por razones idénticas.

(para revisiones, véanse Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203 y Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Variaciones isotópicas

La presente invención incluye todos los ligandos peptídicos marcados con (radio)isótopos farmacéuticamente aceptables de la invención, en donde uno o más átomos se reemplazan por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra habitualmente en la naturaleza, y ligandos peptídicos de la invención, en donde se unen grupos quelantes metálicos (denominados "efectores") que son capaces de contener (radio)isótopos relevantes, y ligandos peptídicos de la invención, en donde determinados grupos funcionales se reemplazan covalentemente por (radio)isótopos relevantes o grupos funcionales marcados isotópicamente.

Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los ligandos peptídicos de la invención comprenden isótopos de hidrógeno, tales como ^2H (D) y ^3H (T), carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , cloro, tal como ^{36}Cl , flúor, tal como ^{18}F , yodo, tales como ^{123}I , ^{125}I y ^{131}I , nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , fósforo, tal como ^{32}P , azufre, tal como ^{35}S , cobre, tal como ^{64}Cu , galio, tales como ^{67}Ga o ^{68}Ga , itrio, tal como ^{90}Y y lutecio, tal como ^{177}Lu , y bismuto, tal como ^{213}Bi .

Determinados ligandos peptídicos marcados isotópicamente de la invención, por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o sustratos tisulares, y para evaluar clínicamente la presencia y/o ausencia de la diana Nectina-4 en tejidos enfermos. Los ligandos peptídicos de la invención pueden tener además valiosas propiedades diagnósticas ya que pueden usarse para detectar o identificar la formación de un complejo entre un compuesto marcado y otras moléculas, péptidos, proteínas, enzimas o receptores. Los métodos de detección o identificación pueden usar compuestos que están marcados con agentes de marcado tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas (por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aequorina y luciferasa), etc. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ^3H (T), y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios de detección fáciles.

La sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio, es decir, ^2H (D), puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o menores requisitos de dosificación y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias.

La sustitución con isótopos emisores de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede ser útil en estudios de topografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación de la diana.

Los compuestos marcados isotópicamente de ligandos peptídicos de la invención pueden prepararse generalmente mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia o mediante procesos análogos a los descritos en los Ejemplos adjuntos usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado previamente.

Armazón molecular

En una realización, el armazón molecular comprende un armazón molecular no aromático. Las referencias en el presente documento a "armazón molecular no aromático" se refieren a cualquier armazón molecular como se define en el presente documento que no contenga un sistema anular carbocíclico o heterocíclico aromático (es decir, insaturado).

Se describen ejemplos adecuados de armazones moleculares no aromáticos en Heinis et al (2014) *Angewandte Chemie*, Edición Internacional 53(6) 1602-1606.

Como se ha indicado en los documentos anteriores, el armazón molecular puede ser una molécula pequeña, tal como una molécula orgánica pequeña.

En una realización el armazón molecular puede ser una macromolécula. En una realización el armazón molecular es una macromolécula compuesta por aminoácidos, nucleótidos o carbohidratos.

En una realización el armazón molecular comprende grupos reactivos que son capaces de reaccionar con uno o más grupos funcionales del polipéptido para formar enlaces covalentes.

El armazón molecular puede comprender grupos químicos que forman el enlace con un péptido, tales como aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, azidas, anhídridos, succinimidas, maleimidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

Un ejemplo de un compuesto que contiene carbonilo $\alpha\beta$ insaturado es 1,1',1''-(1,3,5-triazinano-1,3,5-triil)triprop-2-en-1-ona (TATA) (*Angewandte Chemie*, Edición Internacional (2014), 53(6), 1602-1606).

Grupos efectores y funcionales

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco que comprende un ligando peptídico como se define en el presente documento conjugado con uno o más grupos efectores y/o funcionales.

Los grupos efectores y/o funcionales pueden unirse, por ejemplo, a los extremos N y/o C del polipéptido, a un aminoácido dentro del polipéptido o al armazón molecular.

Los grupos efectores apropiados incluyen anticuerpos y partes o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, un grupo efector puede incluir una región constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH1 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH3 de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos, además de uno o más dominios de región constante. Un grupo efector también puede comprender una región bisagra de un anticuerpo (dicha región normalmente se encuentra entre los dominios CH1 y CH2 de una molécula de IgG).

En una realización adicional de este aspecto de la invención, un grupo efector de acuerdo con la presente invención es una región Fc de una molécula de IgG. Ventajosamente, un grupo efector-ligando peptídico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una fusión Fc-ligando peptídico que tiene una semivida $t_{1/2}$ de un día o más, dos días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más o 7 días o más. Lo más ventajosamente, el ligando peptídico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una fusión Fc-ligando peptídico que tiene una semivida $t_{1/2}$ de un día o más.

Los grupos funcionales incluyen, en general, grupos de unión, fármacos, grupos reactivos para la adhesión de otras entidades, grupos funcionales que ayudan a la captación de los péptidos macrocíclicos en las células y similares.

La capacidad de los péptidos para penetrar en las células permitirá que los péptidos sean eficaces contra dianas intracelulares. Las dianas a las que pueden acceder los péptidos con capacidad de penetrar en las células incluyen factores de transcripción, moléculas de señalización intracelular tales como tirosina quinasas y moléculas implicadas en la ruta apoptótica. Los grupos funcionales que permiten la penetración en las células incluyen péptidos o grupos químicos que se han añadido al péptido o al armazón molecular. Los péptidos tales como aquellos derivados de VP22, HIV-Tat, una proteína homeobox de *Drosophila* (Antennapedia), por ejemplo, como se describe en Chen y Harrison, Biochemical Society Transactions (2007) Volumen 35, parte 4, p821; Gupta *et al.* en Advanced Drug Discovery Reviews (2004) Volumen 57 9637. Los ejemplos de péptidos cortos que han demostrado ser eficientes en la translocación a través de las membranas plasmáticas incluyen el péptido penetratina de 16 aminoácidos de la proteína Antennapedia de *Drosophila* (Derossi *et al.* (1994) J Biol. Chem. Volumen 269 p10444), el "péptido anfipático modelo" de 18 aminoácidos (Oehlke *et al.* (1998) Biochim Biophys Acts Volumen 1414 p127) y regiones ricas en arginina de la proteína TAT del VIH. Los enfoques no peptídicos incluyen el uso de imitadores de moléculas pequeñas o SMOC que pueden unirse fácilmente a biomoléculas (Okuyama *et al.* (2007) Nature Methods Volumen 4 p153). Otras estrategias químicas para añadir grupos guanidinio a las moléculas también mejoran la penetración celular (Elson-Scwab *et al.* (2007) J Biol Chem Volumen 282 p13585). Pueden añadirse moléculas de pequeño peso molecular tales como esteroides al armazón molecular para mejorar su captación en las células.

Una clase de grupos funcionales que pueden unirse a ligandos peptídicos incluye anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, tales como Fab, Fv o fragmentos de dominio único. En particular, pueden usarse anticuerpos que se unen a proteínas capaces de aumentar la semivida del ligando peptídico *in vivo*.

En una realización, un grupo efector-ligando peptídico de acuerdo con la invención tiene una semivida $t_{1/2}$ seleccionada del grupo que consiste en: 12 horas o más, 24 horas o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 7 días o más, 8 días o más, 9 días o más, 10 días o más, 11 días o más, 12 días o más, 13 días o más, 14 días o más, 15 días o más o 20 días o más. Ventajosamente un grupo o composición efector-ligando peptídico de acuerdo con la invención tendrá una semivida $t_{1/2}$ en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización adicional, tendrá una semivida $t_{1/2}$ de un día o más. En otra realización más adicional, estará en el intervalo de 12 a 26 horas.

En una realización particular de la invención, el grupo funcional se selecciona de un quelante de metales, que es adecuado para complejar radioisótopos metálicos de relevancia médica.

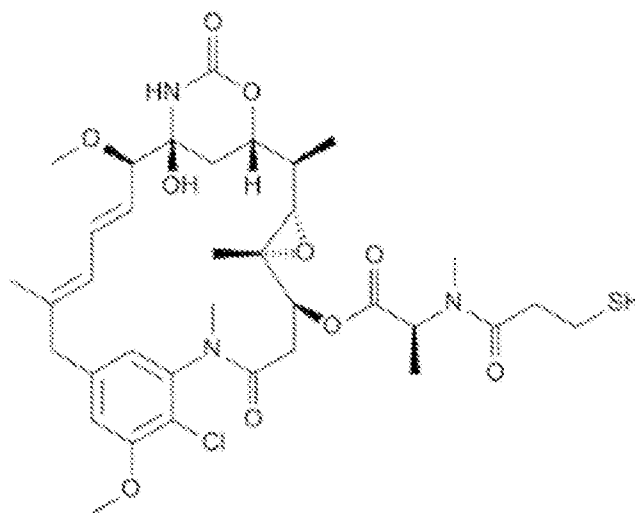
Los posibles grupos efectores también incluyen enzimas, por ejemplo, tales como carboxipeptidasa G2 para su uso en terapia enzimática/profármaco, donde el ligando peptídico reemplaza a los anticuerpos en ADEPT.

En una realización particular de la invención, el grupo funcional se selecciona de un fármaco, tal como un agente citotóxico para la terapia del cáncer. Los ejemplos adecuados incluyen: agentes alquilantes tales como cisplatino y carboplatino, así como oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida; Antimetabolitos que incluyen análogos de purina, azatioprina y mercaptopurina o análogos de pirimidina; alcaloides y terpenoides vegetales que incluyen alcaloides de la vinca tales como Vincristina, Vinblastina, Vinorelbina y Vindesina; Podofilotoxina y sus derivados etopósido y tenipósido; Taxanos, incluyendo paclitaxel, originalmente conocido como Taxol; inhibidores de la topoisomerasa que incluyen camptotecinas: irinotecán y topotecán, e inhibidores de tipo II que incluyen amsacrina,

etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido. Los agentes adicionales pueden incluir antibióticos antitumorales que incluyen el inmunosupresor dactinomicina (que se usa en trasplantes de riñón), doxorubicina, epirubicina, bleomicina, caliqueamicinas y otros.

- 5 En una realización particular adicional de la invención, el agente citotóxico se selecciona de maitansinoides (tal como DM1) o monometilauristatinas (tal como MMAE).

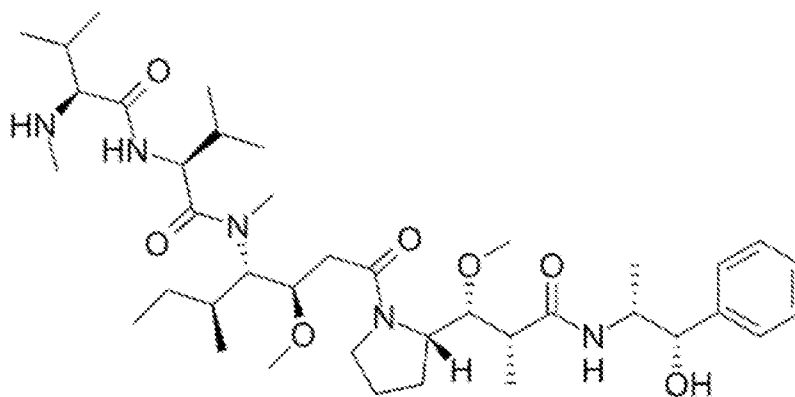
DM1 es un agente citotóxico que es un derivado de maitansina que contiene tiol y tiene la siguiente estructura:



10

Los datos se presentan en el presente documento en la Tabla 3 que demuestra los efectos de un ligando peptídico conjugado con una toxina que contiene DM1.

- 15 La monometilauristatina E (MMAE) es un agente antineoplásico sintético y tiene la siguiente estructura:



20

Los datos se presentan en el presente documento en la Tabla 3 que demuestra los efectos de los ligandos peptídicos conjugados con una toxina que contiene MMAE.

En otra realización particular adicional de la invención, el agente citotóxico se selecciona de monometil auristatina E (MMAE).

- 25 En una realización, el agente citotóxico está unido al péptido bicíclico mediante un enlace escindible, tal como un enlace disulfuro o un enlace sensible a la proteasa. En una realización adicional, los grupos adyacentes al enlace disulfuro se modifican para controlar el impedimento del enlace disulfuro y, por esto, la tasa de escisión y la liberación concomitante del agente citotóxico.

- 30 Un trabajo publicado estableció el potencial de modificar la susceptibilidad del enlace disulfuro a la reducción introduciendo un impedimento estérico en ambos lados del enlace disulfuro (Kellogg et al (2011) Bioconjugate Chemistry, 22, 717). Un mayor grado de impedimento estérico reduce la tasa de reducción por el glutatión intracelular y también por los agentes reductores extracelulares (sistémicos), reduciendo consecuentemente la facilidad con la que se libera la toxina, tanto dentro como fuera de la célula. Por lo tanto, la selección de la estabilidad óptima del

disulfuro en la circulación (que minimiza los efectos secundarios indeseables de la toxina) frente a la liberación eficiente en el medio intracelular (que maximiza el efecto terapéutico) puede lograrse mediante una selección cuidadosa del grado de impedimento en cada lado del enlace disulfuro.

- 5 El obstáculo en cada lado del enlace disulfuro se modula mediante la introducción de uno o más grupos metilo en la entidad de direccionamiento (aquí, el péptido bicíclico) o en el lado de la toxina de la construcción molecular.

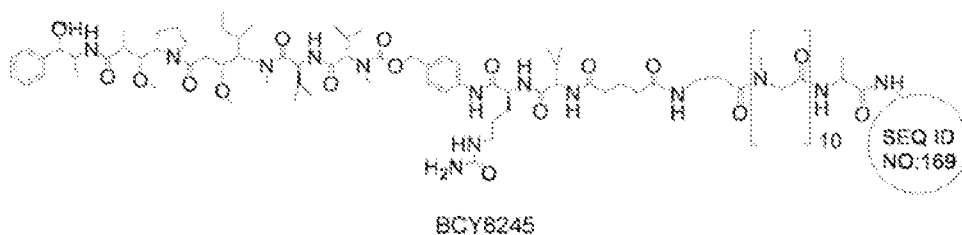
En una realización, el agente citotóxico y el enlazador se seleccionan de cualquier combinación de aquellos descritos en el documento WO 2016/067035.

- 10 En una realización, el enlazador entre dicho agente citotóxico y dicho péptido bicíclico comprende uno o más restos de aminoácidos. Los ejemplos de restos de aminoácidos adecuados como enlazadores adecuados incluyen Ala, Cit, Lys, Trp y Val.

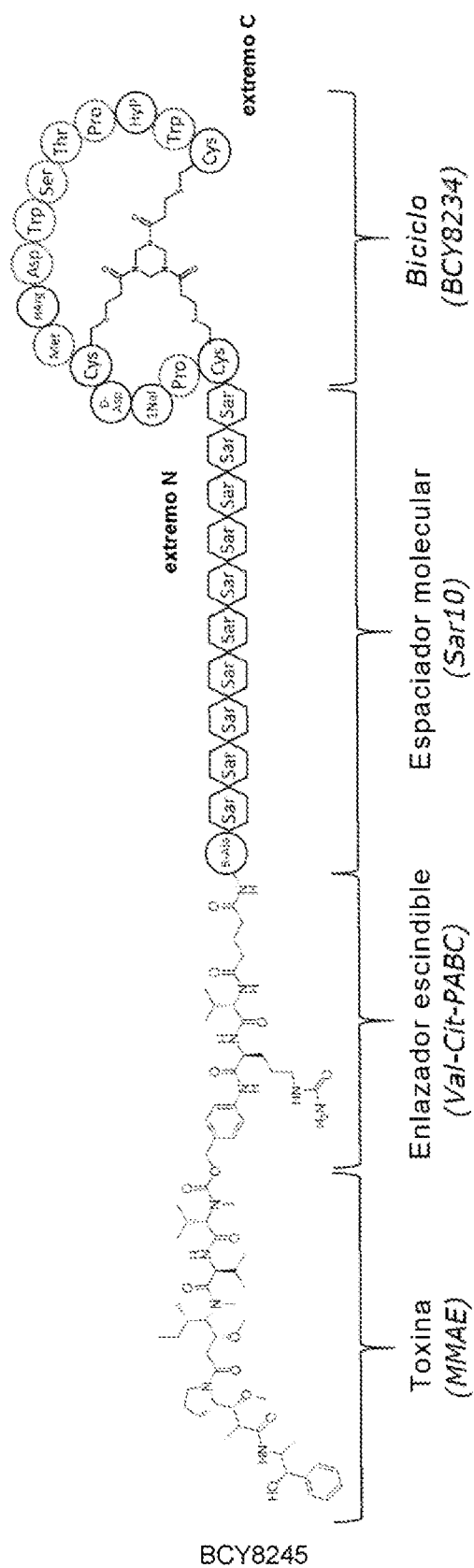
- 15 En una realización, el agente citotóxico se selecciona de MMAE y dicho conjugado de fármaco comprende adicionalmente un enlazador seleccionado de: -PABC-Cit-Val-Glutaril- o -PABC-ciclobutil-Ala-Cit-βAla-, en donde PABC representa p-aminobencilcarbamato. Los detalles completos del enlazador que contiene ciclobutilo pueden encontrarse en Wei et al (2018) J. Med. Chem. 61, 989-1000. En una realización adicional, el agente citotóxico se selecciona de MMAE y el enlazador es -PABC-Cit-Val-Glutaril-.

- 20 En una realización alternativa, el agente citotóxico es DM1 y dicho conjugado farmacológico comprende además un enlazador que es -SPDB-(SO₃H)-, en donde SPDB representa 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo.

- 25 En una realización alternativa, el agente citotóxico es MMAE, el péptido bicíclico se selecciona de BCY8234 como se define en el presente documento y el enlazador se selecciona de -PABC-Cit-Val-Glutaril-. Este BDC se conoce en el presente documento como BCY8245 y se representa esquemáticamente como:



- 30 y también puede representarse de manera más detallada como:



Se presentan datos en el presente documento que demuestran una excelente unión a la Nectina-4 humana para BCY8245 en el ensayo de unión SPR como se muestra en la Tabla 3. Este BDC también demostró una buena actividad antitumoral en el modelo de cáncer de pulmón no microcítico como se muestra en el Ejemplo 1, el modelo de cáncer de vejiga como se muestra en el Ejemplo 2, el modelo de cáncer de páncreas como se muestra en el Ejemplo 3 y el

modelo de cáncer de mama como se muestra en el Ejemplo 4.

En una realización alternativa, el agente citotóxico es MMAE, el péptido bicíclico se selecciona de BCY8234 como se define en el presente documento y el enlazador se selecciona de -PABC-ciclobutil-(B-Ala)-. Este BDC se conoce en el presente documento como BCY8549. Se presentan datos en el presente documento que demuestran una excelente unión a la Nectina-4 humana para BCY8549 en el ensayo de unión SPR como se muestra en la Tabla 3.

En una realización adicional, el conjugado de fármaco bicíclico se selecciona de BCY8245 o BCY8549. En una realización adicional más, el conjugado de fármaco bicíclico es BCY8245. El fármaco conjugado BCY8245 demostró una actividad antitumoral dependiente de la dosis superior como se demuestra en los datos descritos en el presente documento.

Síntesis

Los péptidos de la presente invención pueden fabricarse sintéticamente mediante técnicas convencionales seguidas de una reacción con un armazón molecular *in vitro*. Cuando esto se realiza, puede usarse la química convencional. Esto permite la preparación rápida a gran escala de material soluble para experimentos posteriores adicionales o validación. Dichos métodos podrían llevarse a cabo usando química convencional tal como aquella descrita en Timmerman *et al* (anteriormente).

Por lo tanto, la invención también se refiere a la fabricación de polipéptidos o conjugados seleccionados como se expone en el presente documento, en donde la fabricación comprende etapas adicionales opcionales como se explica a continuación. En una realización, estas etapas se realizan en el polipéptido/conjugado del producto final elaborado mediante síntesis química.

Opcionalmente, los restos de aminoácidos en el polipéptido de interés pueden sustituirse cuando se elabora un conjugado o complejo.

Los péptidos también pueden extenderse, para incorporar, por ejemplo, otro bucle y, por lo tanto, introducir múltiples especificidades.

Para extender el péptido, simplemente puede extenderse químicamente en su extremo N o el extremo C o dentro de los bucles usando lisinas protegidas ortogonalmente (y análogos) usando química convencional en fase sólida o fase de solución. Pueden usarse técnicas de (bio)conjugación convencionales para introducir un extremo N o C activado o activable. Como alternativa pueden realizarse adiciones mediante condensación de fragmentos o ligadura química natural, por ejemplo, como se describe en (Dawson *et al.* 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779) o mediante enzimas, por ejemplo, usando subtiligasa como se describe en (Chang *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 20 de diciembre de 1994; 91(26):12544-8 o en Hikari *et al* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volumen 18, número 22, 15 de noviembre de 2008, páginas 6000-6003).

Como alternativa, los péptidos pueden extenderse o modificarse mediante una conjugación adicional a través de enlaces disulfuro. Esto tiene la ventaja adicional de permitir que el primer y el segundo péptido se disocien entre sí una vez dentro del entorno reductor de la célula. En este caso, el armazón molecular (por ejemplo, TATA) podría añadirse durante la síntesis química del primer péptido para que reaccione con los tres grupos de cisteína; a continuación, podría añadirse una cisteína o tiol adicional al extremo N o C del primer péptido, de tal manera que esta cisteína o tiol solo reaccionara con una cisteína o tiol libre del segundo péptido, formando un conjugado péptido bicíclico ligado a disulfuro-péptido.

Las técnicas similares se aplican igualmente a la síntesis/acoplamiento de dos macrociclos bicíclicos y biespecíficos, creando potencialmente una molécula tetraespecífica.

Adicionalmente, la adición de otros grupos funcionales o grupos efectores puede lograrse de la misma manera, usando la química apropiada, acoplándose en los extremos N o C o a través de cadenas laterales. En una realización, el acoplamiento se realiza de tal manera que no bloquee la actividad de ninguna de las entidades.

Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ligando peptídico o un fármaco como se define en el presente documento junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Generalmente, los presentes ligandos peptídicos se usarán en forma purificada junto con excipientes o portadores farmacológicamente apropiados. Normalmente, estos excipientes o portadores incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y/o tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y Ringer lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo polipeptídico en

suspensión, pueden elegirse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer. Los conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, también puede estar presentes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición).

Los ligandos peptídicos de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Estos pueden incluir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y diversos fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos agentes citotóxicos u otros agentes junto con los ligandos proteicos de la presente invención, o incluso combinaciones de polipéptidos seleccionados de acuerdo con la presente invención que tienen diferentes especificidades, tales como polipéptidos seleccionados usando diferentes ligandos diana, ya sea que se agrupen o no antes de la administración.

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de aquellas conocidas comúnmente por los expertos en la materia. Para la terapia, los ligandos peptídicos de la invención pueden administrarse a cualquier paciente de acuerdo con técnicas convencionales. La administración puede ser por cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía transdérmica, a través de la vía pulmonar o también, apropiadamente, por infusión directa con un catéter. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se administrarán por inhalación. La dosis y frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo y la condición del paciente, la administración simultánea de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que el médico debe tener en cuenta.

Los ligandos peptídicos de esta invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un portador adecuado antes de su uso. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Los expertos en la materia apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a diversos grados de pérdida de actividad y que los niveles pueden tener que ajustarse hacia arriba para compensar.

Las composiciones que contienen los presentes ligandos peptídicos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En determinadas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para lograr al menos una inhibición parcial, supresión, modulación, destrucción, o algún otro parámetro medible, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para alcanzar esta dosis dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del sistema inmunológico del propio paciente, pero generalmente varían de 0,005 a 5,0 mg de ligando peptídico seleccionado por kilogramo de peso corporal, usándose más comúnmente dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes ligandos peptídicos o cócteles de los mismos también pueden administrarse en dosis similares o ligeramente inferiores.

Una composición que contiene un ligando peptídico de acuerdo con la presente invención puede usarse en entornos profilácticos y terapéuticos para facilitar la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, los ligandos peptídicos descritos en el presente documento pueden usarse de manera extracorpórea o selectiva *in vitro* para destruir, agotar o eliminar de otro modo de manera eficaz una población de células diana de una colección heterogénea de células. La sangre de un mamífero puede combinarse de manera extracorpórea con los ligandos peptídicos seleccionados, por lo que las células no deseadas se destruyen o se eliminan de otro modo de la sangre para devolverlas al mamífero de acuerdo con técnicas convencionales.

Coadministración con uno o más agentes terapéuticos distintos

Dependiendo de la afección o enfermedad particular, a tratar, los agentes terapéuticos adicionales que normalmente se administran para tratar esa afección, también puede estar presente en las composiciones de la presente invención. Por lo tanto, en una realización, la composición farmacéutica comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales. Como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar una enfermedad o afección particular, se conocen como "apropiados para la enfermedad o afección, que se va a tratar".

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o afección desvelada que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto desvelado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y administrar simultánea o secuencialmente una cantidad eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como aquellos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el método incluye coadministrar un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el método incluye coadministrar dos agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, la combinación del compuesto desvelado y el agente o agentes terapéuticos adicionales actúa

sinérgicamente.

Un compuesto de la presente invención también puede usarse en combinación con procesos terapéuticos conocidos, por ejemplo, la administración de hormonas o radiación. En determinadas realizaciones, un compuesto proporcionado se usa como radiosensibilizador, especialmente para el tratamiento de tumores que presentan poca sensibilidad a radioterapia.

Un compuesto de la presente invención puede administrarse solo o en combinación con uno o más compuestos terapéuticos diferentes, adoptando la posible terapia de combinación la forma de combinaciones fijas o la administración de un compuesto de la invención y uno o más de otros compuestos terapéuticos que se escalonan o se administran independientemente entre sí, o la administración combinada de combinaciones fijas y uno o más de otros compuestos terapéuticos. Un compuesto de la presente invención puede administrarse además especialmente para terapia tumoral en combinación con quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, fototerapia, intervención quirúrgica, o una combinación de estas. La terapia a largo plazo es igualmente posible como lo es la terapia adyuvante en el contexto de otras estrategias de tratamiento, como se ha descrito anteriormente. Otros tratamientos posibles son la terapia para mantener el estado del paciente después de la regresión tumoral o incluso quimioterapia preventiva, por ejemplo, en pacientes en riesgo.

Pueden administrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales por separado de un compuesto o composición de la invención, como parte de un régimen de dosificación múltiple. Como alternativa, uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden ser parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con un compuesto de la presente invención en una única composición. Si se administran como un régimen de dosificación múltiple, uno o más agentes terapéuticos diferentes y un compuesto o composición de la invención pueden administrarse simultánea, secuencialmente o separados entre sí por un periodo de tiempo, por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas entre sí. En algunas realizaciones, uno o más otros agentes terapéuticos y un compuesto o composición de la invención se administran como un régimen de dosificación múltiple con un intervalo de más de 24 horas.

Como se usa en el presente documento, el término "combinación", "combinado", y términos relacionados se refieren a la administración simultánea o secuencial de agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos simultánea o secuencialmente en formas farmacéuticas unitarias separadas o conjuntamente en una forma farmacéutica unitaria individual. En consecuencia, la presente invención proporciona una forma de dosificación unitaria individual que comprende un compuesto de la presente invención, uno o más agentes terapéuticos distintos y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad tanto de un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos distintos (en aquellas composiciones que comprenden un agente terapéutico adicional como se describe anteriormente) que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma monodosis variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Preferentemente, una composición de la presente invención debe formularse de tal manera que pueda administrarse una dosificación de entre 0,01 - 100 mg/kg de peso corporal/día de un compuesto de la invención.

En aquellas composiciones que comprenden uno o más agentes terapéuticos adicionales distintos, el uno o más otros agentes terapéuticos y un compuesto de la invención pueden actuar sinérgicamente. Por lo tanto, la cantidad del uno o más agentes terapéuticos adicionales en dichas composiciones puede ser inferior al requerido en una monoterapia que utilice solamente dicho agente terapéutico. En dichas composiciones puede administrarse una dosis de entre 0,01 - 1.000 µg/kg de peso corporal/día del uno o más agentes terapéuticos distintos.

La cantidad del uno o más agentes terapéuticos distintos presente en las composiciones de la presente invención puede no ser más que la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende ese agente terapéutico como el único principio activo. Preferentemente la cantidad del uno o más agentes terapéuticos distintos en las composiciones desveladas en el presente documento variará de aproximadamente el 50 % al 100 % de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende ese agente como el único agente terapéuticamente activo. En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos se administran en una dosis de aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 % de la cantidad normalmente administrada para ese agente. Como se usa en el presente documento, la expresión "normalmente administrado" significa la cantidad de un agente terapéutico aprobado por la FDA proporcionada para dosificación de acuerdo con el prospecto del inserto de la etiqueta de la FDA.

Los compuestos de la presente invención o composiciones farmacéuticas de los mismos, también pueden incorporarse en composiciones para recubrir un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, endoprótesis y catéteres. Las endoprótesis vasculares, por ejemplo, se han usado para superar la reestenosis (reestrechamiento de la pared del vaso tras una lesión). Sin embargo, los pacientes que usan endoprótesis

u otros dispositivos implantables están en riesgo de formación de coágulos o activación de plaquetas. Estos efectos indeseados pueden prevenirse o mitigarse prerrecubriendo el dispositivo con una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un inhibidor de quinasa. Los dispositivos implantables recubiertos con un compuesto de la presente invención son otra realización de la presente invención.

5

Agentes terapéuticos ilustrativos distintos

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP). En algunas realizaciones, un inhibidor de PARP se selecciona de olaparib (Lynparza®, AstraZeneca);
10 rucaparib (Rubraca®, Clovis Oncology); niraparib (Zejula®, Tesaro); talazoparib (MDV3800/BMN 673/LT00673, Medivation/Pfizer/Biomarin); veliparib (ABT-888, AbbVie); y BGB-290 (BeiGene, Inc.).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC). En algunas realizaciones, un inhibidor de HDAC se selecciona de vorinostat (Zolinza®, Merck); romidepsina (Istodax®, Celgene); panobinostat (Farydak®, Novartis); belinostat (Beleodaq®, Spectrum Pharmaceuticals); entinostat (SNDX-275, Syndax Pharmaceuticals) (NCT00866333); y chidamida (Epidaza®, HBI-8000, Chipscreen Biosciences, China).

15

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de CDK, tales como un inhibidor de CDK4/CDK6. En algunas realizaciones, un inhibidor de CDK 4/6 se selecciona de palbociclib (Ibrance®, Pfizer);
20 ribociclib (Kisqali®, Novartis); abemaciclib (Ly2835219, Eli Lilly); y trilaciclib (G1T28, G1 Therapeutics).

20

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son inhibidores de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). En algunas realizaciones, un inhibidor de PI3K se selecciona de idelalisib (Zydelig®, Gilead), alpelisib (BYL719, Novartis), taselisib (GDC-0032, Genentech/Roche); pictilisib (GDC-0941, Genentech/Roche); copanlisib (BAY806946, Bayer); duvelisib (anteriormente IPI-145, Infinity Pharmaceuticals); PQR309 (Piquar Therapeutics, Suiza); y TGR1202 (anteriormente RP5230, TG Therapeutics).

25

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos adicionales son agentes terapéuticos a base de platino, también denominados platinos. Los platinos provocan la reticulación del ADN, de tal manera que inhiben la reparación del ADN y/o la síntesis del ADN, principalmente en células que se reproducen rápidamente, tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, un agente terapéutico basado en platino se selecciona de cisplatino (Platinol®, Bristol-Myers Squibb); carboplatino (Paraplatin®, Bristol-Myers Squibb; también, Teva; Pfizer); oxaliplatino (Eloxitin® Sanofi-Aventis); nedaplatino (Aqupla®, Shionogi), picoplatino (Poniard Pharmaceuticals); y satraplatino (JM-216, Agennix).

30

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un compuesto de taxano, que provoca la ruptura de los microtúbulos, que son esenciales para la división celular. En algunas realizaciones, un compuesto de taxano se selecciona de paclitaxel (Taxol®, Bristol-Myers Squibb), docetaxel (Taxotere®, Sanofi-Aventis; Docefrez®, Sun Pharmaceutical), paclitaxel unido a albúmina (Abraxane®, Abraxis/Celgene), cabazitaxel (Jevtana®, Sanofi-Aventis) y SID530 (SK Chemicals, Co.) (NCT00931008).

35

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos diferentes son inhibidores de nucleósidos o agentes terapéuticos que interfieren con la síntesis normal de ADN, síntesis de proteínas, replicación celular, o inhibirá de otra manera las células que proliferan rápidamente.

40

En algunas realizaciones, un inhibidor de nucleósidos se selecciona de trabectedina (agente alquilante de guanidina, Yondelis®, Janssen Oncology), mechlorethamina (agente alquilante, Valchlor®, Aktelion Pharmaceuticals); vincristina (Oncovin®, Eli Lilly; Vincasar®, Teva Pharmaceuticals; Marqibo®, Talon Therapeutics); temozolomida (profármaco del agente alquilante 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) Temodar®, Merck); inyección de citarabina (ara-C, análogo antimetabólico de citidina, Pfizer); lomustina (agente alquilante, CeeNU®, Bristol-Myers Squibb); Gleostine®, NextSource Biotechnology); azacitidina (análogo de nucleósido pirimidina de citidina, Vidaza®, Celgene); mepesuccinato de omacetaxina (éster de cefalotaxina) (inhibidor de la síntesis de proteínas, Synribo®, Teva Pharmaceuticals); asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (enzima para el agotamiento de asparagina, Elspar®, Lundbeck; Erwinaze®, ELISA Pharma); mesilato de eribulina (inhibidor de microtúbulos, antimetabólico basado en tubulina, Halaven®, Eisai); cabazitaxel (inhibidor de microtúbulos, antimetabólico basado en tubulina, Jevtana®, Sanofi-Aventis); capacetrina (inhibidor de la timidilato sintasa, Xeloda®, Genentech); bendamustina (derivado bifuncional de mecloretamina, que se cree que forma reticulaciones de ADN entre cadenas, Treanda®, Cephalon/Teva); ixabepilona (análogo semisintético de la epotilona B, inhibidor de microtúbulos, antimetabólico basado en tubulina, Ixempra®, Bristol-Myers Squibb); nelarabina (profármaco del análogo de desoxiguanosina, inhibidor metabólico de nucleósidos, Arranon®, Novartis); clorafabina (profármaco del inhibidor de la ribonucleótido reductasa, inhibidor competitivo de la desoxicitidina, Clolar®, Sanofi-Aventis); y trifluridina y tipiracilo (análogo de nucleósido basado en timidina e inhibidor de timidina fosforilasa, Lonsurf®, Taiho Oncology).

50

55

60

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos diferentes son inhibidores de la quinasa o antagonistas del VEGF-R. Los inhibidores de VEGF y los inhibidores de quinasa aprobados útiles en la presente invención incluyen: bevacizumab (Avastin®, Genentech/Roche) un anticuerpo monoclonal anti-VEGF; ramucirumab (Cyramza®, Eli Lilly),

65

un anticuerpo anti-VEGFR-2 y ziv-aflibercept, también conocido como VEGF Trap (Zaltrap®; Regeneron/Sanofi). Inhibidores de VEGFR, tales como regorafenib (Stivarga®, Bayer); vandetanib (Caprelsa®, AstraZeneca); axitinib (Inlyta®, Pfizer); y lenvatinib (Lenvima®, Eisai); inhibidores de Raf, tales como sorafenib (Nexavar®, Bayer AG y Onyx); dabrafenib (Tafinlar®, Novartis); y vemurafenib (Zelboraf®, Genentech/Roche); Inhibidores de MEK, tales como cobimetanib (Cotellic®, Exelixis/Genentech/Roche); trametinib (Mekinist®, Novartis); inhibidores de la tirosina quinasa Bcr-Abl, tales como imatinib (Gleevec®, Novartis); nilotinib (Tasigna®, Novartis); dasatinib (Sprycel®, BristolMyersSquibb); bosutinib (Bosulif®, Pfizer); y ponatinib (Inclusig®, Ariad Pharmaceuticals); inhibidores de Her2 y EGFR, tales como gefitinib (Iressa®, AstraZeneca); erlotinib (Tarceeva®, Genentech/Roche/Astellas); lapatinib (Tykerb®, Novartis); afatinib (Gilotrif®, Boehringer Ingelheim); osimertinib (dirigido a EGFR activado, Tagrisso®, AstraZeneca); y brigatinib (Alunbrig®, Ariad Pharmaceuticals); inhibidores de c-Met y VEGFR2, tales como cabozantinib (Cometriq®, Exelixis); e inhibidores multiquinasa, tales como sunitinib (Sutent®, Pfizer); pazopanib (Votrient®, Novartis); inhibidores de ALK, tales como crizotinib (Xalkori®, Pfizer); ceritinib (Zykadia®, Novartis); y alectinib (Alecenza®, Genentech/Roche); inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton, tales como ibrutinib (Imbruvica®, Pharmacyclics/Janssen); e inhibidores del receptor Flt3, tales como midostaurina (Rydapt®, Novartis).

Otros inhibidores de quinasas y antagonistas de VEGF-R que están en desarrollo y pueden usarse en la presente invención incluyen: tivozanib (Aveo Pharmaceuticals); vatalanib (Bayer/Novartis); lucitanib (Clovis Oncology); dovitinib (TKI258, Novartis); Chiauianib (Chipscreen Biosciences); CEP-11981 (Cephalon); linifanib (Abbott Laboratories); neratinib (HKI-272, Puma Biotechnology); radotinib (Supect®, IY5511, Il-Yang Pharmaceuticals, S. Korea); ruxolitinib (Jakafi®, Incyte Corporation); PTC299 (PTC Therapeutics); CP-547.632 (Pfizer); foretinib (Exelixis, GlaxoSmithKline); quizartinib (Daiichi Sankyo) y motesanib (Amgen/Takeda).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de mTOR, que inhibe la proliferación celular, la angiogénesis y la captación de glucosa. En algunas realizaciones, un inhibidor de mTOR es everolimus (Afinitor®, Novartis); temsirolimus (Torisel®, Pfizer); y sirolimus (Rapamune®, Pfizer).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor del proteasoma. Los inhibidores del proteasoma aprobados útiles en la presente invención incluyen bortezomib (Velcade®, Takeda); carfilzomib (Kyprolis®, Amgen); e ixazomib (Ninlaro®, Takeda).

En algunas realizaciones, uno o más otros agentes terapéuticos son un antagonista del factor de crecimiento, tal como un antagonista del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o su receptor (EGFR). Los antagonistas de PDGF aprobados que pueden usarse en la presente invención incluyen (Velcade®, Eli Lilly). Los antagonistas de EGFR aprobados que pueden usarse en la presente invención incluyen: cetuximab (Erbix®, Eli Lilly); necitumumab (Portrazza®, Eli Lilly), panitumumab (Vectibix®, Amgen); y osimertinib (dirigido a EGFR activado, Tagrisso®, AstraZeneca).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de la aromatasa. En algunas realizaciones, un inhibidor de la aromatasa se selecciona de: exemestano (Aromasin®, Pfizer); anastrozole (Arimidex®, AstraZeneca) y letrozol (Femara®, Novartis).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un antagonista de la ruta hedgehog. Los inhibidores de la ruta hedgehog aprobados que pueden usarse en la presente invención incluyen: sonidegib (Odomzo®, Sun Pharmaceuticals); y vismodegib (Erivedge®, Genentech), ambos para el tratamiento del carcinoma de células basales.

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos diferentes son un inhibidor del ácido fólico. Los inhibidores del ácido fólico aprobados útiles en la presente invención incluyen pemetrexed (Alimta®, Eli Lilly).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son inhibidores del receptor de quimiocina CC 4 (CCR4). Los inhibidores de CCR4 que se están estudiando que pueden ser útiles en la presente invención incluyen mogamulizumab (Poteligeo®, Kyowa Hakko Kirin, Japón).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son inhibidores de la isocitrato deshidrogenasa (IDH). Los inhibidores de IDH que se están estudiando que pueden usarse en la presente invención incluyen: AG120 (Celgene; NCT02677922); AG221 (Celgene, NCT02677922; NCT02577406); BAY1436032 (Bayer, NCT02746081); IDH305 (Novartis, NCT02987010).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos diferentes son un inhibidor de la arginasa. Los inhibidores de arginasa que se están estudiando que pueden usarse en la presente invención incluyen: AEB1102 (arginasa recombinante pegilada, Aeglea Biotherapeutics), que se está estudiando en ensayos clínicos de fase 1 para leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico (NCT02732184) y tumores sólidos (NCT02561234); y CB-1158 (Calithera Biosciences).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de glutaminasa. Los inhibidores de glutaminasa que se están estudiando que pueden usarse en la presente invención incluyen CB-839 (Calithera

Biosciences).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos adicionales son anticuerpos que se unen a antígenos tumorales, es decir, proteínas expresadas en la superficie celular de las células tumorales. Los anticuerpos aprobados que se unen a antígenos tumorales que pueden usarse en la presente invención incluyen: rituximab (Rituxan®, Genentech/BiogenIdec); ofatumumab (anti-CD20, Arzerra®, GlaxoSmithKline); obinutuzumab (anti-CD20, Gazyva®, Genentech); ibritumomab (anti-CD20 e Yttrium-90, Zevalin®, Spectrum Pharmaceuticals); daratumumab (anti-CD38, Darzalex®, Janssen Biotech); dinutuximab (anti-gluco lipido GD2, Unituxin®, United Therapeutics); trastuzumab (anti-HER2, Herceptin®, Genentech); ado-trastuzumab emtansina (anti-HER2, fusionada a emtansina, Kadcyla®, Genentech); y pertuzumab (anti-HER2, Perjeta®, Genentech); y brentuximab vedotina (conjugado anti-CD30-fármaco, Adcetris®, Seattle Genetics).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de la topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa aprobados útiles en la presente invención incluyen: irinotecán (Onivyde®, Merrimack Pharmaceuticals); topotecán (Hycamtin®, GlaxoSmithKline). Los inhibidores de topoisomerasa que se están estudiando que pueden usarse en la presente invención incluyen pixantrona (Pixuvri®, CTI Biopharma).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son inhibidores de proteínas antiapoptóticas, tales como BCL-2. Los antiapoptóticos aprobados que pueden usarse en la presente invención incluyen: venetoclax (Venclexta®, AbbVie/Genentech); y nd blinatumomab (Blinicyto®, Amgen). Otros agentes terapéuticos dirigidos a proteínas apoptóticas que se han sometido a pruebas clínicas y que pueden usarse en la presente invención incluyen navitoclax (ABT-263, Abbott), un inhibidor de BCL-2 (NCT02079740).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor del receptor de andrógenos. Los inhibidores de los receptores de andrógenos aprobados útiles en la presente invención incluyen enzalutamida (Xtandi®, Astellas/Medivation); los inhibidores aprobados de la síntesis de andrógenos incluyen abiraterona (Zytiga®, Centocor/Ortho); antagonista del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina aprobado (GnRH) (degaralix, Firmagon®, Ferring Pharmaceuticals).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos adicionales son moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), que interfiere con la síntesis o actividad de los estrógenos. Los SERM aprobados útiles en la presente invención incluyen raloxifeno (Evista®, Eli Lilly).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son inhibidores de la resorción ósea. Un agente terapéutico aprobado que inhibe la resorción ósea es Denosumab (Xgeva®, Amgen), un anticuerpo que se une a RANKL, evita la unión a su receptor RANK, se encuentra en la superficie de los osteoclastos, sus precursores, y células gigantes similares a osteoclastos, que media la patología ósea en tumores sólidos con metástasis óseas. Otros agentes terapéuticos aprobados que inhiben la resorción ósea incluyen bisfosfonatos, tales como ácido zoledrónico (Zometa®, Novartis).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor de la interacción entre las dos proteínas supresoras p53 primarias, MDMX y MDM2. Los inhibidores de las proteínas supresoras p53 que se están estudiando y que pueden usarse en la presente invención incluyen ALRN-6924 (Aileron), un péptido básico que se une de manera equipotente y altera la interacción de MDMX y MDM2 con p53. ALRN-6924 se está evaluando actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de AML, síndrome mielodisplásico avanzado (MDS) y linfoma periférico de linfocitos T (PTCL) (NCT02909972; NCT02264613).

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta o TGFβ). Los inhibidores de las proteínas TGF-beta que se están estudiando que pueden usarse en la presente invención incluyen NIS793 (Novartis), un anticuerpo anti-TGF-beta que se está probando en la práctica clínica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, de pulmón, hepatocelular, colorrectal, pancreático, de próstata y renal (NCT 02947165). En algunas realizaciones, el inhibidor de las proteínas TGF-beta es fresolimumab (GC1008; Sanofi-Genzyme), que se están estudiando para melanoma (NCT00923169); carcinoma de células renales (NCT00356460); y cáncer de pulmón no microcítico (NCT02581787). Adicionalmente, en algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es una trampa TGF-beta, tal como se describe en Connolly *et al.* (2012) *Int'l J. Biological Sciences* 8:964-978. Un compuesto terapéutico actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos es M7824 (Merck KgaA - anteriormente MSB0011459X), que es un compuesto trampa biespecífico anti-PD-L1/TGFβ (NCT02699515); y (NCT02517398). M7824 comprende un anticuerpo IgG1 completamente humano contra PD-L1 fusionado al dominio extracelular del receptor II de TGF-beta humano, que funciona como una "trampa" de TGFβ.

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos se seleccionan de glembatumumab vedotin-monometil auristatina E (MMAE) (Celldex), un anticuerpo antiglicoproteína NMB (gpNMB) (CR011) unido a MMAE citotóxico. gpNMB es una proteína sobreexpresada por múltiples tipos de tumores asociados con la capacidad de metástasis de las células cancerosas.

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos distintos son un compuesto antiproliferativo. Tales compuestos antiproliferativos incluyen, pero no se limitan a: inhibidores de aromatasa; antiestrógenos; inhibidores de topoisomerasa I; inhibidores de topoisomerasa II; compuestos activos de microtúbulos; compuestos alquilantes; inhibidores de histona desacetilasa; compuestos que inducen procesos de diferenciación celular; inhibidores de ciclooxigenasa; inhibidores de MMP; inhibidores de mTOR; antimetabolitos antineoplásicos; compuestos de platino; compuestos que se dirigen a/disminuyen la actividad proteína o lípido quinasa y otros compuestos antiangiogénicos; compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de una fosfatasa de proteínas o lípidos; agonistas de gonadorelina; antiandrógenos; inhibidores de metionina aminopeptidasa; inhibidores de metaloproteínasa de matriz; bisfosfonatos; modificadores de la respuesta biológica; anticuerpos antiproliferativos; inhibidores de heparanasa; inhibidores de las isoformas oncogénicas de Ras; inhibidores de la telomerasa; inhibidores de proteasoma; compuestos usados en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas; compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de Flt-3; inhibidores de Hsp90 tal como 17-AAG (17-alilaminogeldanamicina, NSC330507), 17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-desmetoxi-geldanamicina, NSC707545), IPI-504, CNF1010, CNF2024, CNF1010 de Conform Therapeutics; temozolomida (Temodar®); inhibidores de la proteína del huso de quinesina, tales como SB715992 o SB743921 de GlaxoSmithKline o pentamidina/clorpromazina de CombinatoRx; inhibidores de MEK tales como ARRY142886 de Array BioPharma, AZd6244 de AstraZeneca, PD181461 de Pfizer y leucovorina.

La expresión "inhibidor de aromatasa" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que inhibe la producción de estrógenos, por ejemplo, la conversión de los sustratos androstenediona y testosterona en estrona y estradiol, respectivamente. El término incluye, pero no se limita a esteroides, especialmente atamestano, exemestano y formestano y, en particular, no esteroides, especialmente aminoglutetimida, rogletimida, piridoglutetimida, trilostano, testolactona, ketoconazol, vorozol, fadrozol, anastrozol y letrozol. El exemestano se comercializa bajo el nombre comercial Aromasin™. El formestano se comercializa bajo el nombre comercial Lentaron™. El fadrozol se comercializa bajo el nombre comercial Afema™. El anastrozol se comercializa bajo el nombre comercial Arimidex™. El letrozol se comercializa bajo los nombres comerciales Femara™ o Femar™. La aminoglutetimida se comercializa bajo el nombre comercial Orimeten™. Una combinación de la invención que comprende un agente quimioterapéutico que es un inhibidor de aromatasa es particularmente útil para el tratamiento de tumores con receptores hormonales positivos, tales como tumores de mama.

El término "antiestrógeno" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que antagoniza el efecto de los estrógenos a nivel de receptores de estrógenos. El término incluye, pero no se limita a tamoxifeno, fulvestrant, raloxifeno y clorhidrato de raloxifeno. El tamoxifeno se comercializa bajo el nombre comercial Nolvadex™. El clorhidrato de raloxifeno se comercializa con el nombre comercial Evista™. El fulvestrant puede administrarse con el nombre comercial Faslodex™. Una combinación de la invención que comprende un agente quimioterapéutico que es un antiestrógeno es particularmente útil para el tratamiento de tumores con receptores de estrógenos positivos, tales como tumores de mama.

El término "antiandrógeno" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que sea capaz de inhibir los efectos biológicos de las hormonas androgénicas e incluye, pero no se limita a, bicalutamida (Casodex™). La expresión "agonista de la gonadorelina" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a abarelix, goserelina y acetato de goserelina. La goserelina puede administrarse con el nombre comercial Zoladex™.

La expresión "inhibidor de topoisomerasa I" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a topotecán, gimatecán, irinotecán, camptotecina y sus análogos, 9-nitrocamptotecina y el conjugado macromolecular de camptotecina PNU-166148. El irinotecán puede administrarse, por ejemplo, en la forma en que se comercializa, por ejemplo bajo la marca registrada Camptosar™. El topotecán se comercializa bajo el nombre comercial Hycamptin™.

La expresión "inhibidor de topoisomerasa II" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a las antraciclina tales como doxorubicina (incluyendo la formulación liposómica, tal como Caelyx™), daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina y nemorrubicina, las antraquinonas mitoxantrona y losoxantrona y las podofilotoxinas etopósido y tenipósido. El etopósido se comercializa bajo el nombre comercial Etopophos™. El tenipósido se comercializa bajo el nombre comercial VM 26-Bristol. La doxorubicina se comercializa bajo el nombre comercial Acridin™ o Adriamycin™. La epirubicina se comercializa bajo el nombre comercial Farmorubicin™. La idarubicina se comercializa, bajo el nombre comercial Zavedos™. La mitoxantrona se comercializa con el nombre comercial Novantron.

La expresión "principio activo de microtúbulos" se refiere a la estabilización de microtúbulos, a compuestos desestabilizadores de microtúbulos e inhibidores de la polimerización de microtúbulos incluyendo, pero no limitado a: taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina o sulfato de vinblastina, vincristina o sulfato de vincristina y vinorelbina; discodermolidas; colchicina y epotilonas y derivados de los mismos. El paclitaxel se comercializa bajo el nombre comercial Taxol™. El docetaxel se comercializa bajo el nombre comercial Taxotere™. El sulfato de vinblastina se comercializa con el nombre comercial Vinblastin R.P™. El sulfato de vincristina se comercializa con el nombre comercial Farmistin™.

La expresión "agente alquilante" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, ciclofosfamida,

ifosfamida, melfalán o nitrosourea (BCNU o Gliadel). La ciclofosfamida se comercializa bajo el nombre comercial Cyclostin™. La ifosfamida se comercializa bajo el nombre comercial Holoxan™.

La expresión "inhibidores de histona desacetilasa" o "inhibidores de HDAC" se refiere a compuestos que inhiben la histona desacetilasa y que poseen actividad antiproliferativa. Esto incluye, pero no se limita a, ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA).

La expresión "antimetabolito antineoplásico" incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo o 5-FU, capecitabina, gemcitabina, compuestos desmetilantes del ADN, tales como 5-azacitidina y decitabina, metotrexato y edatrexato y antagonistas del ácido fólico tales como pemetrexed. La capecitabina se comercializa bajo el nombre comercial Xeloda™. La gemcitabina se comercializa bajo el nombre comercial Gemzar™.

La expresión "compuesto de platino" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, carboplatino, cisplatino, cisplatino y oxaliplatino. El carboplatino puede administrarse, por ejemplo, en la forma en que se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada Carboplat™. El oxiplatino puede administrarse, por ejemplo, en la forma en que se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada Eloxatin™.

La expresión "compuestos que se dirigen a/disminuyen una actividad proteína o lípido quinasa; o una actividad fosfatasa de proteínas o lípidos; o compuestos antiangiogénicos adicionales" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, inhibidores de la proteína tirosina quinasa y/o serina y/o treonina quinasa o inhibidores de la lípido quinasa, tales como: a) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), tales como compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de PDGFR, especialmente compuestos que inhiben el receptor de PDGF, tales como un derivado de N-fenil-2-pirimidina-amina, tales como imatinib, SU101, SU6668 y GFB-111; b) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR); c) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad del receptor I del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-IR), tales como compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de IGF-IR, especialmente compuestos que inhiben la actividad quinasa del receptor de IGF-I o anticuerpos que se dirigen al dominio extracelular del receptor de IGF-I o sus factores de crecimiento; d) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores tirosina quinasa Trk o inhibidores de efrina B4; e) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores tirosina quinasa Axl; f) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad del receptor tirosina quinasa Ret; g) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores tirosina quinasa Kit/SCFR, tales como imatinib; h) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores tirosina quinasa c-Kit, que forman parte de la familia PDGFR, tales como compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores tirosina quinasa c-Kit, especialmente compuestos que inhiben el receptor c-Kit, tales como imatinib; i) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los miembros de la familia c-Abl, sus productos de fusión génica (por ejemplo, BCR-Abl quinasa) y mutantes, tales como compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los miembros de la familia c-Abl y sus productos de fusión génica, tales como un derivado de N-fenil-2-pirimidina-amina, tales como imatinib o nilotinib (AMN107); PD180970; AG957; NSC 680410; PD173955 de ParkeDavis; o dasatinib (BMS-354825); j) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los miembros de la familia de serina/treonina quinasas de proteína quinasa C (PKC) y Raf, miembros de las familias MEK, SRC, JAK/pan-JAK, FAK, PDK1, PKB/Akt, Ras/MAPK, PI3K, SYK, TYK2, BTK y TEC y/o miembros de la familia de quinasas ciclodependientes (CDK) incluyendo derivados de estaurosporina, tales como midostaurina; algunos ejemplos de compuestos adicionales incluyen UCN-01, safinol, BAY 43-9006, Briostatina 1, Perifosina, Ilmofofosina, RO 318220 y RO 320432; GO 6976; Isis 3521; LY333531-LY379196; compuestos de isoquinolina; FTI; PD184352 o QAN697 (un inhibidor de P13K) o AT7519 (inhibidor de CDK); k) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los inhibidores de proteínas tirosina quinasa, tales como compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de inhibidores de proteínas tirosina quinasa incluyen mesilato de imatinib (Gleevec™) o tirfostina tales como tirfostina A23/RG-50810; AG 99; tirfostina AG 213; tirfostina AG 1748; tirfostina AG 490; tirfostina B44; enantiómero (+) de tirfostina B44; tirfostina AG 555; AG 494; tirfostina AG 556, AG957 y adafostina (éster de adamantilo de ácido 4-[(2,5-dihidroxifenil)metil]amino}-benzoico; NSC 680410, adafostina); l) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo- o heterodímeros) y sus mutantes, tales como compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben los miembros de la familia receptor tirosina quinasa del EGF, tales como el receptor de EGF, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 o se unen a EGF o ligandos relacionados con EGF, CP 358774, ZD 1839, ZM 105180; trastuzumab (Herceptin™), cetuximab (Erbix™), Iressa, Tarceva, OSI-774, CI-1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 o E7.6.3 y derivados de 7H-pirrol-2,3-d]pirimidina; m) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad del receptor c-Met, tales como compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de c-Met, especialmente compuestos que inhiben la actividad quinasa del receptor c-Met, o anticuerpos que se dirigen al dominio extracelular de c-Met o se unen a HGF, n) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad quinasa de uno o más miembros de la familia JAK (JAK1/JAK2/JAK3/TYK2 y/o pan-JAK), incluyendo pero no limitado a PRT-062070, SB-1578, baricitinib, pacritinib, momelotinib, VX-509, AZD-1480, TG-101348, tofacitinib y ruxolitinib; o) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad quinasa de PI3 quinasa (PI3K) incluyendo pero no limitado a ATU-027, SF-1126, DS-7423, PBI-05204, GSK-2126458, ZSTK-474, buparlisib, pictrelisib, PF-

4691502, BYL-719, dactolisib, XL-147, XL-765 e idelalisib; y; y p) compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben los efectos de señalización de la proteína hedgehog (Hh) o las rutas del receptor smoothened (SMO), incluyendo pero no limitado a ciclopamina, vismodegib, itraconazol, erismodegib e IPI-926 (saridegib).

- 5 La expresión "inhibidor de PI3K" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a compuestos que tienen actividad inhibidora contra una o más enzimas de la familia de las fosfatidilinositol-3-quinasas, incluyendo, pero no limitado a PI3K α , PI3K γ , PI3K δ , PI3K β , PI3K-C2 α , PI3K-C2 β , PI3K-C2 γ , Vps34, p110- α , p110- β , p110- γ , p110- δ , p85- α , p85- β , p55- γ , p150, p101 y p87. Los ejemplos de inhibidores de PI3K útiles en la presente invención incluyen pero no se limitan a ATU-027, SF-1126, DS-7423, PBI-05204, GSK-2126458, ZSTK-474, buparlisib, pictrelisib, PF-4691502, BYL-719, dactolisib, XL-147, XL-765 e idelalisib.

- 15 La expresión "inhibidor de Bcl-2" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a compuestos que tienen actividad inhibidora contra la proteína 2 del linfoma de células B (Bcl-2), incluyendo pero no limitado a ABT-199, ABT-731, ABT-737, apogoposol, inhibidores de pan-Bcl-2 de Ascenta, curcumina (y análogos de la misma), inhibidores dobles de Bcl-2/Bcl-xL (Infinity Pharmaceuticals/Novartis Pharmaceuticals), Genasense (G3139), HA14-1 (y análogos del mismo; véase el documento WO 2008/118802), navitoclax (y análogos del mismo, véase el documento US 7.390.799), NH-1 (Universidad Farmacéutica de Shenayng), obatoclax (y análogos del mismo, véase el documento WO 2004/106328), S-001 (Gloria Pharmaceuticals), compuestos de la serie TW (Univ. de Michigan) y venetoclax. En algunas realizaciones el inhibidor de Bcl-2 es un agente terapéutico de molécula pequeña. En algunas realizaciones el inhibidor de Bcl-2 es un peptidomimético.

- 25 La expresión "inhibidor de BTK" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a compuestos que tienen actividad inhibidora contra la tirosina quinasa de Bruton (BTK), incluyendo, pero no limitado a AVL-292 e ibrutinib.

- La expresión "inhibidor de SYK" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a compuestos que tienen actividad inhibidora contra la tirosina quinasa del bazo (SYK), incluyendo pero no limitado a PRT-062070, R-343, R-333, Excellair, PRT-062607 y fostamatinib.

- 30 Algunos ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de BTK y afecciones tratables mediante tales compuestos en combinación con compuestos de la presente invención pueden encontrarse en el documento WO 2008/039218 y el documento WO 2011/090760.

- 35 Algunos ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de SYK y afecciones tratables mediante tales compuestos en combinación con compuestos de la presente invención pueden encontrarse en el documento WO 2003/063794, el documento WO 2005/007623 y el documento WO 2006/078846.

- 40 Algunos ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de PI3K y afecciones tratables mediante tales compuestos en combinación con compuestos de la presente invención pueden encontrarse en el documento WO 2004/019973, el documento WO 2004/089925, el documento WO 2007/016176, el documento US 8138347, el documento WO 2002/088112, el documento WO 2007/084786, el documento WO 2007/129161, el documento WO 2006/122806, el documento WO 2005/113554 y el documento WO 2007/044729.

- 45 Algunos ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de JAK y afecciones tratables mediante tales compuestos en combinación con compuestos de la presente invención pueden encontrarse en el documento WO 2009/114512, el documento WO 2008/109943, el documento WO 2007/053452, el documento WO 2000/142246 y el documento WO 2007/070514.

- 50 Algunos compuestos antiangiogénicos adicionales incluyen compuestos que tienen otro mecanismo para su actividad, por ejemplo, no relacionado con la inhibición de proteína o lípido quinasas, por ejemplo, talidomida (Thalomid™) y TNP-470.

- 55 Los ejemplos de inhibidores del proteasoma útiles para su uso en combinación con compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a bortezomib, disulfiram, epigallocatequina-3-galato (EGCG), salinosporamida A, carfilzomib, ONX-0912, CEP-18770 y MLN9708.

- Los compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de una fosfatasa de proteínas o lípidos por ejemplo, inhibidores de la fosfatasa 1, fosfatasa 2A o CDC25, tales como ácido okadaico o un derivado del mismo.

- 60 Los compuestos que inducen procesos de diferenciación celular incluyen, pero no se limitan a, ácido retinoico, α - γ - o δ -tocoferol o α - γ - o δ -tocotrienol.

- 65 La expresión inhibidor de la ciclooxigenasa como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, inhibidores de Cox-2, ácido 2-arilaminofenilacético sustituido con 5-alquilo y derivados, tales como celecoxib (Celebrex™), rofecoxib (Vioxx™), etoricoxib, valdecoxib o un ácido 5-alquil-2-arilaminofenilacético, tales como ácido 5-metil-2-(2'-cloro-6'-fluoroanilino)fenilacético y lumiracoxib.

El término "bifosfonatos" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, ácido etridrónico, clodronico, tiludronico, pamidronico, alendronico, ibandronico, risedronico y zoledronico. El ácido etridrónico se comercializa con el nombre comercial Didronel™. El ácido clodronico se comercializa con el nombre comercial Bonefos™. El ácido tiludronico se comercializa con el nombre comercial Skelid™. El ácido pamidronico se comercializa con el nombre comercial Aredia™. El ácido alendronico se comercializa con el nombre comercial Fosamax™. El ácido ibandronico se comercializa con el nombre comercial Bondranat™. El ácido risedronico se comercializa con el nombre comercial Actonel™. El ácido zoledronico se comercializa con el nombre comercial Zometa™. La expresión "inhibidores de mTOR" se refiere a compuestos que inhiben la diana de rapamicina (mTOR) de mamíferos y que poseen actividad antiproliferativa tales como sirolimus (Rapamune®), everolimus (Certican™), CCI-779 y ABT578.

La expresión "inhibidor de heparanasa" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la degradación de sulfato de heparina. El término incluye, pero no se limita a, PI-88. La expresión "modificador de la respuesta biológica" como se usa en el presente documento se refiere a una linfocina o interferones.

La expresión "inhibidor de las isoformas oncogénicas de Ras", tales como H-Ras, K-Ras o N-Ras, como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad oncogénica de Ras; por ejemplo, un "inhibidor de farnesil transferasa" tales como L-744832, DK8G557 o R115777 (Zarnestra™). La expresión "inhibidor de telomerasa" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de telomerasa. Los compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la telomerasa son especialmente compuestos que inhiben el receptor de la telomerasa, tales como telomestatina.

La expresión "inhibidor de la metionina aminopeptidasa" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la metionina aminopeptidasa. Los compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de la metionina aminopeptidasa incluyen, pero no se limitan a, bengamida o un derivado de la misma.

La expresión "inhibidor del proteasoma" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad del proteasoma. Los compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad del proteasoma incluyen, pero no se limitan a, Bortezomib (Velcade™) y MLN 341.

La expresión "inhibidor de metaloproteinasas de matriz" o (inhibidor de "MMP") como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, inhibidores peptidomiméticos y no peptidomiméticos de colágeno, derivados de tetraciclina, por ejemplo, el inhibidor peptidomimético de hidroxamato batimastat y su análogo marimastat biodisponible por vía oral (BB-2516), prinomastat (AG3340), metastat (NSC 683551) BMS-279251, BAY 12-9566, TAA211, MMI270B o AAJ996.

La expresión "compuestos usados en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, inhibidores de la tirosina quinasa de tipo FMS, que son compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores de tirosina quinasa de tipo FMS (Flt-3R); interferón, 1-β-D-arabinofuransilcitosina (ara-c) y bisulfán; e inhibidores de ALK, que son compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la linfoma quinasa anaplásica.

Los compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores de tirosina quinasa de tipo FMS (Flt-3R) son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben los miembros de la familia quinasa del receptor Flt-3R, tales como PKC412, midostaurina, un derivado de estaurosporina, SU11248 y MLN518.

La expresión "inhibidores de HSP90" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad ATPasa intrínseca de HSP90; degradan, se dirigen a, disminuyen o inhiben las proteínas cliente de HSP90 a través de la ruta del proteasoma de ubiquitina. Los compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad ATPasa intrínseca de HSP90 son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben la actividad ATPasa de HSP90, tales como 17-alilamino,17-desmetoxigeldanamicina (17AAG), un derivado de geldanamicina; otros compuestos relacionados con geldanamicina; inhibidores de radicol y HDAC.

La expresión "anticuerpos antiproliferativos" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, trastuzumab (Herceptin™), Trastuzumab-DM1, erbitux, bevacizumab (Avastin™), rituximab (Rituxan®), PRO64553 (anti-CD40) y anticuerpo 2C4. Por anticuerpos se entiende anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos formados a partir de al menos 2 anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

Para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML), los compuestos de la presente invención pueden usarse en combinación con terapias convencionales contra la leucemia, especialmente en combinación con terapias usadas para el tratamiento de AML. En particular, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en combinación con, por ejemplo, inhibidores de farnesil transferasa y/u otros fármacos útiles para el tratamiento de AML, tales como

Daunorrubicina, Adriamicina, Ara-C, VP-16, Tenipósido, Mitoxantrona, Idarrubicina, Carboplatino y PKC412.

Otros compuestos antileucémicos incluyen, por ejemplo, Ara-C, un análogo de pirimidina, que es el derivado 2'-alfa-hidroxi ribosa (arabinósido) de la desoxicitidina. También se incluye el análogo purínico de hipoxantina, 6-mercaptopurina (6-MP) y fosfato de fludarabina. Los compuestos que se dirigen a, disminuyen o inhiben la actividad de inhibidores de histona desacetilasas (HDAC, por sus siglas en inglés) tales como butirato sódico y ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA, por sus siglas en inglés) inhiben la actividad de las enzimas conocidas como histona desacetilasas. Los inhibidores específicos de HDAC incluyen MS275, SAHA, FK228 (anteriormente FR901228), Tricostatina A y compuestos desvelados en el documento US 6.552.065 incluyendo, pero no limitado a, N-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y N-hidroxi-3-[4-[(2-hidroxi-1H-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, especialmente la sal de lactato. Los antagonistas de los receptores de somatostatina como se usan en el presente documento se refieren a compuestos que se dirigen a, tratan o inhiben el receptor de somatostatina tales como octreótido y SOM230. Los enfoques que dañan las células tumorales se refieren a enfoques tales como la radiación ionizante. La expresión "radiación ionizante" mencionada anteriormente y en lo sucesivo en el presente documento significa radiación ionizante que se produce como rayos (tales como rayos X y rayos gamma) o partículas (tales como partículas alfa y beta) electromagnéticas. La radiación ionizante se proporciona en, pero no limitado a, radioterapia y se conoce en la técnica. Véanse Hellman, Principles of Radiation Therapy, Cancer, en Principles and Practice of Oncology, Devita *et al.*, Eds., 4ª Edición, Vol. 1, pp. 248-275 (1993).

También se incluyen aglutinantes de EDG e inhibidores de ribonucleótido reductasa. La expresión "aglutinantes de EDG" como se usa en el presente documento se refiere a una clase de inmunosupresores que modulan la recirculación de linfocitos, tales como FTY720. La expresión "inhibidores de ribonucleótido reductasa" se refiere a análogos de nucleósidos de pirimidina o purina que incluyen, pero no limitado a, fludarabina y/o arabinósido de citosina (ara-C), 6-tioguanina, 5-fluorouracilo, cladribina, 6-mercaptopurina (especialmente en combinación con ara-C contra la ALL) y/o pentostatina. Los inhibidores de la ribonucleótido reductasa son especialmente derivados de hidroxiurea o 2-hidroxi-1H-isoindol-1,3-diona.

También se incluyen en particular aquellos compuestos, proteínas o anticuerpos monoclonales del VEGF tales como: 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, succinato de 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina; Angiostatin™, Endostatin™; amidas de ácido antranílico; ZD4190; Zde474; SU5416; SU6668; bevacizumab; o anticuerpos anti-VEGF o anticuerpos antirreceptor de VEGF, tal como rhuMAb y RHUFAb, aptámero de VEGF tal como Macugen; inhibidores de FLT-4, inhibidores de FLT-3, anticuerpo IgG1 contra VEGFR-2, angiozima (RPI 4610) y bevacizumab (Avastin™).

La terapia fotodinámica como se usa en el presente documento se refiere a la terapia que usa determinados productos químicos conocidos como compuestos fotosensibilizadores para tratar o prevenir cánceres. Los ejemplos de terapia fotodinámica incluyen el tratamiento con compuestos, tales como Visudyne™ y porfímero sódico.

Los esteroides angiostáticos como se usan en el presente documento se refieren a compuestos que bloquean o inhiben la angiogénesis, tales como, por ejemplo, anecortave, triamcinolona, hidroclorisona, 11- α -epihidroclorisona, cortisona, 17 α -hidroxiprogesterona, corticoesterona, desoxicorticoesterona, testosterona, estrona y dexametasona.

Los implantes que contienen corticosteroides se refieren a compuestos, tales como fluocinolona y dexametasona.

Otros compuestos quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: alcaloides vegetales, compuestos hormonales y antagonistas; modificadores de la respuesta biológica, preferentemente linfocinas o interferones; oligonucleótidos o derivados de oligonucleótidos antisentido; ARNhc o ARNip; o diversos compuestos o compuestos con otro mecanismo de acción o desconocido.

La estructura de los compuestos activos identificados por números de código, nombres genéricos o comerciales puede tomarse de la edición actual del compendio convencional "The Merck Index" o a partir de bases de datos, por ejemplo, Patents International (por ejemplo, IMS World Publications).

Agentes inmunooncológicos ilustrativos

En algunas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos diferentes son un agente inmunooncológico. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente inmunooncológico" se refiere a un agente que es eficaz para mejorar, estimular y/o regular positivamente respuestas inmunitarias en un sujeto. En algunas realizaciones, la administración de un agente inmunooncológico con un compuesto de la invención tiene un efecto sinérgico en el tratamiento de un cáncer.

Un agente inmunooncológico puede ser, por ejemplo, un fármaco de molécula pequeña, un anticuerpo o una molécula biológica o pequeña. Los ejemplos de agentes inmunooncológicos biológicos incluyen, pero no se limitan a, vacunas contra el cáncer, anticuerpos y citocinas. En algunas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal es humanizado o humano.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es (i) un agonista de un receptor estimulador (incluyendo un coestimulador) o (ii) un antagonista de una señal inhibidora (incluyendo un coinhibidor) en linfocitos T, dando ambos como resultado la amplificación de respuestas de linfocitos T específicos de antígeno.

Determinadas moléculas estimulantes e inhibidoras son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). Una familia importante de ligandos unidos a la membrana que se unen a receptores coestimuladores o coinhibidores es la familia B7, que incluye B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) y B7-H6. Otra familia de ligandos unidos a membrana que se unen a receptores coestimuladores o coinhibidores es la familia TNF de moléculas que se unen a miembros de la familia del receptor de TNF análogos, que incluye CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, Linfotóxina α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, Linfotóxina α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY y NGFR.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es una citocina que inhibe la activación de linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF y otras citocinas inmunosupresoras) o una citocina que estimula la activación de linfocitos T, para estimular una respuesta inmunitaria.

En algunas realizaciones, una combinación de un compuesto de la invención y un agente inmunooncológico puede estimular las respuestas de los linfocitos T. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es: (i) un antagonista de una proteína que inhibe la activación de las células T (por ejemplo, inhibidores de puntos de control inmunitarios) tales como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 y TIM-4; o (ii) un agonista de una proteína que estimula la activación de los linfocitos T tales como B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 y CD28H.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de los receptores inhibidores de las células NK o un agonista de los receptores activadores de las células NK. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de KIR, tal como lirilumab.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agente que inhibe o agota los macrófagos o monocitos, incluyendo pero no limitado a antagonistas de CSF-1R tales como anticuerpos antagonistas de CSF-1R, incluyendo RG7155 (documento WO 2011/70024, documento WO 2011/107553, documento WO 2011/131407, documento WO 2013/87699, documento WO 2013/119716, documento WO 2013/132044) o FPA-008 (documento WO 2011/140249; documento WO 2013/169264; documento WO 2014/036357).

En algunas realizaciones, se selecciona un agente inmunooncológico entre agentes agonistas que ligan receptores coestimuladores positivos, agentes bloqueantes que atenúan la señalización a través de receptores inhibidores, antagonistas y uno o más agentes que aumentan sistémicamente la frecuencia de linfocitos T antitumorales, agentes que superan distintas rutas supresoras inmunitarias dentro del microentorno tumoral (por ejemplo, bloquear la unión de receptor inhibidor (por ejemplo, interacciones PD-L1/PD-1), disminuir o inhibir Treg (por ejemplo, usando un anticuerpo monoclonal anti CD25 (por ejemplo, daclizumab) o mediante agotamiento de perlas anti CD25 *ex vivo*), inhiben enzimas metabólicas tales como IDO o invierten/previene la energía o el agotamiento de linfocitos T) y agentes que desencadenan la activación inmunitaria innata y/o inflamación en sitios tumorales.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de CTLA-4. En algunas realizaciones, un antagonista de CTLA-4 es un anticuerpo antagonista de CTLA-4. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista CTLA-4 es YERVOY (ipilimumab) o tremelimumab.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de PD-1. En algunas realizaciones, un antagonista de PD-1 se administra mediante infusión. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor de muerte programada-1 (PD-1) e inhibe la actividad de PD-1. En algunas realizaciones, un antagonista de PD-1 es un anticuerpo antagonista de PD-1. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista PD-1 es OPDIVO (nivolumab), KEYTRUDA (pembrolizumab) o MEDI-0680 (AMP-514; documento WO 2012/145493). En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico puede ser pidilizumab (CT-011). En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es una proteína recombinante compuesta por el dominio extracelular de PD-L2 (B7-DC) fusionado a la porción Fc de IgG1, denominada AMP-224.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de PD-L1. En algunas realizaciones, un antagonista de PD-L1 es un anticuerpo antagonista de PD-L1. En algunas realizaciones, un anticuerpo PD-L1 es MPDL3280A (RG7446; documento WO 2010/077634), durvalumab (MEDI4736), BMS-936559 (documento WO 2007/005874) y MSB0010718C (documento WO 2013/79174).

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de LAG-3. En algunas realizaciones, un

antagonista de LAG-3 es un anticuerpo antagonista de LAG-3. En algunas realizaciones, un anticuerpo LAG3 es BMS-986016 (documento WO 2010/19570, documento WO 2014/08218), o IMP-731 o IMP-321 (documento WO 2008/132601, documento WO 2009/44273).

- 5 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agonista de CD137 (4-1BB). En algunas realizaciones, un agonista de CD137 (4-1BB) es un anticuerpo agonista de CD137. En algunas realizaciones, un anticuerpo CD137 es urelumab o PF-05082566 (documento WO 2012/32433).
- 10 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agonista de GITR. En algunas realizaciones, un agonista de GITR es un anticuerpo agonista de GITR. En algunas realizaciones, un anticuerpo GITR es BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (documento WO 2006/105021, documento WO 2009/009116) o MK-4166 (documento WO 2011/028683).
- 15 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de la indolamina (2,3)-dioxigenasa (IDO). En algunas realizaciones, un antagonista de IDO se selecciona de: epacadostat (INCB024360, Incyte); indoximod (NLG-8189, NewLink Genetics Corporation); capmanitib (INC280, Novartis); GDC-0919 (Genentech/Roche); PF-06840003 (Pfizer); BMS:F001287 (Bristol-Myers Squibb); Phy906/KD108 (Phytoceutica); y una enzima que descompone la quinurrenina (Kynase, Kyn Therapeutics); y NLG-919 (documento WO 2009/73620, documento WO 2009/1156652, documento WO 2011/56652, documento WO 2012/142237).
- 20 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agonista de OX40. En algunas realizaciones, un agonista de OX40 es un anticuerpo agonista de OX40. En algunas realizaciones, un anticuerpo OX40 es MEDI-6383 o MEDI-6469.
- 25 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de OX40L. En algunas realizaciones, un antagonista de OX40L es un anticuerpo antagonista de OX40. En algunas realizaciones, un antagonista de OX40L es RG-7888 (documento WO 2006/029879).
- 30 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agonista de CD40. En algunas realizaciones, un agonista de CD40 es un anticuerpo agonista de CD40. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un antagonista de CD40. En algunas realizaciones, un antagonista de CD40 es un anticuerpo antagonista de CD40. En algunas realizaciones, un anticuerpo CD40 es lucatumumab o dacetuzumab.
- 35 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agonista de CD27. En algunas realizaciones, un agonista de CD27 es un anticuerpo agonista de CD27. En algunas realizaciones, un anticuerpo CD27 es varilumab.
- En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es MGA271 (para B7H3) (documento WO 2011/109400).
- 40 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, anatumomab mafenatox, apolizumab, atezolizumab, avelumab, blinatumomab, BMS-936559, catumaxomab, durvalumab, epacadostat, epratuzumab, indoximod, inotuzumab ozogamicina, intelumumab, ipilimumab, isatuximab, lambrolizumab, MED14736, MPDL3280A, nivolumab, obinutuzumab, ocaratuzumab, ofatumumab, olatatumab, pembrolizumab, pidilizumab, rituximab, ticilimumab, samalizumab o tremelimumab.
- 45 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agente inmunoestimulante. Por ejemplo, los anticuerpos que bloquean el eje inhibidor de PD-1 y PD-L1 pueden desencadenar linfocitos T reactivos a tumores activados y se ha demostrado en ensayos clínicos que inducen respuestas antitumorales duraderas en un número cada vez mayor de histologías tumorales, incluyendo algunos tipos de tumores que no se han considerado convencionalmente sensibles a inmunoterapia. Véanse, por ejemplo, Okazaki, T. *et al.* (2013) Nat. Immunol. 14, 1212-1218; Zou *et al.* (2016) Sci. Transl. Med. 8. El anticuerpo anti-PD-1 nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb, también conocido como ONO-4538, MDX1106 y BMS-936558), ha mostrado potencial para mejorar la supervivencia general en pacientes con carcinoma de células renales claras (RCC) que habían experimentado progresión de la enfermedad durante o después de una terapia antiangiogénica previa.
- 50
- 55 En algunas realizaciones, el agente terapéutico inmunomodulador induce específicamente la apoptosis de las células tumorales. Los agentes terapéuticos inmunomoduladores aprobados que pueden usarse en la presente invención incluyen: pomalidomida (Pomalyst®, Celgene); lenalidomida (Revlimid®, Celgene); mebutato de ingenol (Picato®, LEO Pharma).
- 60 En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es una vacuna contra el cáncer. En algunas realizaciones, la vacuna contra el cáncer se selecciona de: sipuleucel-T (Provenge®, Dendreon/Valeant Pharmaceuticals), que se ha aprobado para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (refractario a las hormonas) asintomático o mínimamente sintomático; y talimogén laherparepvec (Imlygic®, BioVex/Amgen, anteriormente conocido como T-VEC), una terapia vírica oncolítica modificada genéticamente aprobada para el tratamiento de la enfermedad cutánea irrecusable, lesiones subcutáneas y nodales en el melanoma. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico adicional se selecciona de una terapia vírica oncolítica tal como pexastimogene devacirpvec
- 65

(PexaVec/JX-594, SillaJen/anteriormente Jennerex Biotherapeutics), un virus vaccinia deficiente en timidina quinasa (TK-) modificado por ingeniería para expresar GM-CSF, para carcinoma hepatocelular (NCT02562755) y melanoma (NCT00429312); pelareorep (Reolysin®, Oncolytics Biotech), una variante del virus respiratorio entérico huérfano (reovirus) que no se replica en células que no están activadas por RAS, en numerosos cánceres, incluyendo cáncer colorrectal (NCT01622543); cáncer de próstata (NCT01619813); cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (NCT01166542); adenocarcinoma pancreático (NCT00998322); y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) (NCT00861627); enadenotucirev (NG-348, PsiOxus, anteriormente conocido como ColoAd1), un adenovirus modificadas por ingeniería para expresar un CD80 de longitud completa y un fragmento de anticuerpo específico para la proteína CD3 del receptor de linfocitos T, en cáncer de ovario (NCT02028117); tumores epiteliales metastásicos o avanzados, tal como en cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cáncer de glándulas salivales (NCT02636036); ONCOS-102 (Targovax/anteriormente Oncos), un adenovirus modificado por ingeniería para expresar GM-CSF, en melanoma (NCT03003676); y enfermedad peritoneal, cáncer colorrectal o cáncer de ovario (NCT02963831); GL-ONC1 (GLV-1h68/GLV-1h153, Genelux GmbH), virus vaccinia modificados por ingeniería genética para expresar betagalactosidasa (beta-gal)/beta-glucoronidasa o beta-gal/simportador de yoduro de sodio humano (hNIS), respectivamente, se estudiaron en carcinomatosis peritoneal (NCT01443260); cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de ovario (NCT 02759588); o CG0070 (Cold Genesys), un adenovirus modificado por ingeniería para expresar GM-CSF, en cáncer de vejiga (NCT02365818).

En algunas realizaciones, un agente inmuno-oncológico se selecciona de: JX-929 (SillaJen/anteriormente Jennerex Biotherapeutics), un virus vaccinia deficiente en factor de crecimiento de vaccinia y TK modificado por ingeniería para expresar citosina desaminasa, que es capaz de convertir el profármaco 5-fluorocitosina en el fármaco citotóxico 5-fluorouracilo; TG01 y TG02 (Targovax/anteriormente Oncos), agentes de inmunoterapia basados en péptidos dirigidos a mutaciones RAS difíciles de tratar; y TILT-123 (TILT Biotherapeutics), un adenovirus modificado por ingeniería denominado: Ad5/3-E2F-delta24-hTNFα-IRES-hIL20; y VSV-GP (ViraTherapeutics), un virus de la estomatitis vesicular (VSV) modificado por ingeniería para expresar la glucoproteína (GP) del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV, por sus siglas en inglés), que puede modificarse por ingeniería adicionalmente para expresar antígenos diseñados para generar una respuesta de linfocitos T CD8⁺ específica de antígeno.

En algunas realizaciones, un agente inmuno-oncológico es un linfocito T modificado por ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico o CAR. Los linfocitos T modificados por ingeniería para expresar dicho receptor de antígenos quimérico se denominan linfocitos CAR-T.

Se han construido CAR que consisten en dominios de unión, que pueden proceder de ligandos naturales, fragmentos variables monocatenarios (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de la superficie celular, fusionados con endodominios que son el extremo funcional del receptor de linfocitos T (TCR), como el dominio de señalización CD3-zeta de los TCR, que es capaz de generar una señal de activación en los linfocitos T. Tras unirse al antígeno, dichos CAR se unen a rutas de señalización endógenas en la célula efectora y generan señales de activación similares a las iniciadas por el complejo TCR.

Por ejemplo, en algunas realizaciones el linfocito CAR-T es uno de los descritos en la Patente de EE.UU. N.º 8.906.682, que desvela linfocitos CAR-T modificados por ingeniería genética para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno (tal como un dominio que se une a CD19), fusionado a un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor de antígenos de linfocitos T (tal como CD3 zeta). Cuando se expresa en el linfocito T, el CAR es capaz de redirigir el reconocimiento del antígeno en función de la especificidad de unión al antígeno. En el caso de CD19, el antígeno se expresa en linfocitos B neoplásicos. Actualmente se están realizando más de 200 ensayos clínicos que emplean CAR-T en una amplia gama de indicaciones. [<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=chimeric+antigen+receptors&pg=1>].

En algunas realizaciones, un agente inmunoestimulador es un activador del receptor y huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico (RORγt). RORγt es un factor de transcripción con funciones clave en la diferenciación y el mantenimiento de los subconjuntos efectores de tipo 17 de linfocitos T CD4⁺ (Th17) y CD8⁺ (Tc17), así como la diferenciación de subpoblaciones de células inmunitarias innatas que expresan IL-17 tal como las células NK. En algunas realizaciones, un activador de RORγt es LYC-55716 (Lycera), que actualmente se está evaluando en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos (NCT02929862).

En algunas realizaciones, un agente inmunoestimulador es un agonista o activador de un receptor de tipo toll (TLR). Los activadores adecuados de TLR incluyen un agonista o activador de TLR9 tal como SD-101 (Dynavax). El SD-101 es un CpG inmunoestimulador que se está estudiando para linfomas de linfocitos B, foliculares y otros (NCT02254772). Los agonistas o activadores de TLR8 que pueden usarse en la presente invención incluyen motolimod (VTX-2337, VentiRx Pharmaceuticals), que se está estudiando para el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (NCT02124850) y el cáncer de ovario (NCT02431559).

Otros agentes inmuno-oncológicos que pueden usarse en la presente invención incluyen: urelumab (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo monoclonal anti-CD137; varilumab (CDX-1127, Celldex Therapeutics), un anticuerpo monoclonal anti-CD27; BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo monoclonal anti-OX40; lirilumab (IPH2102/BMS-986015, Innate Pharma, Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo monoclonal anti-KIR; monalizumab

(IPH2201, Innate Pharma, AstraZeneca) un anticuerpo monoclonal anti-NKG2A; andecaliximab (GS-5745, Gilead Sciences), un anticuerpo anti-MMP9; y MK-4166 (Merck & Co.), un anticuerpo monoclonal anti-GITR.

En algunas realizaciones, un agente inmunoestimulante se selecciona de elotuzumab, mifamurtida, un agonista o activador de un receptor de tipo toll y un activador de RORyt.

En algunas realizaciones, un agente terapéutico inmunoestimulante es la interleucina humana recombinante 15 (rhIL-15). La rhIL-15 se ha probado en la clínica como terapia para el melanoma y el carcinoma de células renales (NCT01021059 y NCT01369888) y las leucemias (NCT02689453). En algunas realizaciones, un agente inmunoestimulante es la interleucina 12 humana recombinante (rhIL-12). En algunas realizaciones, un inmunoterapéutico basado en IL-15 adecuado es la IL-15 heterodimérica (hetIL-15, Novartis/Admune), un complejo de fusión compuesto por una forma sintética de IL-15 endógena en forma de complejo con la cadena alfa del receptor de IL-15 de la proteína de unión a IL-15 soluble (IL15:siIL-15RA), que se ha probado en ensayos clínicos de fase 1 para melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (NCT02452268). En algunas realizaciones, una interleucina 12 humana recombinante (rhIL-12) es NM-IL-12 (Neumedicines, Inc.), NCT02544724 o NCT02542124.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico se selecciona de aquellos descritos en Jerry L. Adams *et al.*, "Big opportunities for small molecules in immuno-oncology", Cancer Therapy 2015, Vol. 14, páginas 603-622. En alguna realización, un agente inmunooncológico se selecciona de los ejemplos descritos en la Tabla 1 de Jerry L. Adams *et al.* En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es una molécula pequeña que se dirige a una diana inmunooncológica seleccionada de los enumerados en la Tabla 2 de Jerry L. Adams *et al.* En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agente de molécula pequeña seleccionado de los enumerados en la Tabla 2 de Jerry L. Adams *et al.*

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico se selecciona de los agentes inmunooncológicos de moléculas pequeñas descritos en Peter L. Toogood, "Small molecule immuno-oncology therapeutic agents", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2018, Vol. 28, páginas 319-329. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un agente que se dirige a las rutas descritas en Peter L. Toogood.

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico se selecciona de aquellos descritos en Sandra L. Ross *et al.*, "Bispecific T cell engager (BiTE®) antibody constructs can mediate bystander tumor cell killing", PLoS ONE 12(8): e0183390. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es una construcción de anticuerpo activador de linfocitos T biespecífico (BiTE®). En algunas realizaciones, una construcción de anticuerpo activador de linfocitos T biespecífico (BiTE®) es una construcción de anticuerpo biespecífico CD19/CD3. En algunas realizaciones, una construcción de anticuerpo activador de linfocitos T biespecífico (BiTE®) es una construcción de anticuerpo biespecífico EGFR/CD3. En algunas realizaciones, una construcción de anticuerpo activador de linfocitos T biespecífico (BiTE®) activa los linfocitos T. En algunas realizaciones, una construcción de anticuerpo activador de linfocitos T biespecífico (BiTE®) activa los linfocitos T, que liberan citocinas que inducen la regulación positiva de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y FAS en células espectadoras. En algunas realizaciones, una construcción de anticuerpo activador de linfocitos T biespecífico (BiTE®) activa linfocitos T lo que provoca la lisis inducida de las células espectadoras. En algunas realizaciones, las células espectadoras se encuentran en tumores sólidos. En algunas realizaciones, las células espectadoras que se están lisando están cerca de linfocitos T activados por BiTE®. En alguna realización, las células espectadoras comprenden células cancerosas negativas al antígeno asociado al tumor (TAA). En alguna realización, las células espectadoras comprenden células cancerosas negativas a EGFR. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un anticuerpo que bloquea el eje PD-L1/PD1 y/o CTLA4. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un linfocito T infiltrante de tumores expandido *ex vivo*. En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es una construcción de anticuerpos biespecíficos o receptores de antígenos quiméricos (CAR) que conectan directamente los linfocitos T con antígenos de superficie asociados a tumores (TAA).

Inhibidores del punto de control inmunitario ilustrativos

En algunas realizaciones, un agente inmunooncológico es un inhibidor del punto de control inmunitario como se describe en el presente documento.

La expresión "inhibidor de punto de control" como se usa en el presente documento se refiere a agentes útiles para prevenir que las células cancerosas eviten el sistema inmunitario del paciente. Uno de los principales mecanismos de subversión de la inmunidad antitumoral se conoce como "agotamiento de linfocitos T", que es el resultado de la exposición crónica a antígenos que ha dado lugar al aumento de los receptores inhibidores. Estos receptores inhibidores sirven como puntos de control inmunitarios para prevenir reacciones inmunitarias descontroladas.

PD-1 y receptores co-inhibitorios tales como el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4, Atenuador de linfocitos B y T (BTLA; CD272), Inmunoglobulina de linfocitos T y Dominio de mucina-3 (Tim-3), Gen de activación de linfocitos-3 (Lag-3; CD223) y otros a menudo se denominan reguladores de puntos de control. Actúan como "guardianes" moleculares que permiten que la información extracelular dicte si la progresión del ciclo celular y otros procesos de

señalización intracelular deben continuar.

En algunas realizaciones, un inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo contra PD-1. PD-1 se une al receptor de muerte celular programada 1 (PD-1) para evitar que el receptor se una al ligando inhibidor PDL-1, anulando de esta manera la capacidad de los tumores para suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral del hospedador.

En un aspecto, el inhibidor de puntos de control es un agente terapéutico biológico o una molécula pequeña. En otro aspecto, el inhibidor de puntos de control es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, una proteína de fusión o una combinación de los mismos. En un aspecto adicional, el inhibidor de puntos de control inhibe una proteína de puntos de control seleccionada de CTLA-4, PDL1, PDL2, PDI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, el documento CHK 1, CHK2, A2aR, ligandos de la familia B-7 o una combinación de los mismos. En un aspecto adicional, el inhibidor de puntos de control interactúa con un ligando de una proteína del punto de control seleccionada de CTLA-4, PDL1, PDL2, PDI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, el documento CHK 1, CHK2, A2aR, ligandos de la familia B-7 o una combinación de los mismos. En un aspecto, el inhibidor de puntos de control es un agente inmunoestimulador, un factor de crecimiento de linfocitos T, una interleucina, un anticuerpo, una vacuna o una combinación de los mismos. En un aspecto adicional, la interleucina es IL-7 o IL-15. En un aspecto específico, la interleucina es IL-7 glucosilada. En un aspecto adicional, la vacuna es una vacuna de células dendríticas (DC).

Los inhibidores de puntos de control incluyen cualquier agente que bloquee o inhiba de manera estadísticamente significativa, las rutas inhibitorias del sistema inmunitario. Dichos inhibidores pueden incluir inhibidores de molécula pequeña o pueden incluir anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a y bloquean o inhiben los receptores de puntos de control inmunitario o los anticuerpos que se unen a y bloquean o inhiben los ligandos de receptores de puntos de control inmunitario. Las moléculas de puntos de control ilustrativas que pueden direccionarse para el bloqueo o la inhibición incluyen, pero no se limitan a, CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, LAG3, TIM3, VISTA, KIR, 2B4 (pertenece a la familia de moléculas de CD2 y se expresa en todas las NK, $\gamma\delta$, y linfocitos T CD8⁺ ($\alpha\beta$) de memoria), CD160 (también denominado BY55), CGEN-15049, CHK 1 y CHK2 quinasas, A2aR y diversos ligandos de la familia B-7. Los ligandos de la familia B7 incluyen, pero no se limitan a, B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 y B7-H7. Dichos inhibidores de puntos de control pueden incluir anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, otras proteínas de unión, agentes terapéuticos biológicos o moléculas pequeñas, que se unen a y bloquean o inhiben la actividad de uno o más de CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD 160 y CGEN-15049. Los inhibidores de puntos de control inmunitario ilustrativos incluyen tremelimumab (anticuerpo que bloquea CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (bloqueante de PD-1), Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PDI), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) e ipilimumab (inhibidor de puntos de control anti-CTLA-4).

Los ligandos de proteínas de puntos de control incluyen, pero no se limitan a PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD28, CD86 y TIM-3.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario se selecciona de un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1 y un antagonista de CTLA-4. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control se selecciona del grupo que consiste en nivolumab (Opdivo®), ipilimumab (Yervoy®) y pembrolizumab (Keytruda®). En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control se selecciona de: nivolumab (anticuerpo anti-PD-1, Opdivo®, Bristol-Myers Squibb); pembrolizumab (anticuerpo anti-PD-1, Keytruda®, Merck); ipilimumab (anticuerpo anti-CTLA-4, Yervoy®, Bristol-Myers Squibb); durvalumab (anticuerpo anti-PD-L1, Imfinzi®, AstraZeneca); y atezolizumab (anticuerpo anti-PD-L1, Tecentriq®, Genentech).

En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control se selecciona del grupo que consiste en lambrolizumab (MK-3475), nivolumab (BMS-936558), pidilizumab (CT-011), AMP-224, MDX-1105, MEDI4736, MPDL3280A, BMS-936559, ipilimumab, lirlumab, IPH2101, pembrolizumab (Keytruda®) y tremelimumab.

En algunas realizaciones, un inhibidor de puntos de control inmunitario es: REGN2810 (Regeneron), un anticuerpo anti-PD-1 probado en pacientes con carcinoma basocelular (NCT03132636); NSCLC (NCT03088540); carcinoma cutáneo de células escamosas (NCT02760498); linfoma (NCT02651662); y melanoma (NCT03002376); pidilizumab (CureTech), también conocido como CT-011, un anticuerpo que se une a PD-1, en ensayos clínicos para el linfoma difuso de linfocitos B grandes y el mieloma múltiple; avelumab (Bavencio®, Pfizer/Merck KGaA), también conocido como MSB0010718C), un anticuerpo IgG1 anti-PD-L1 totalmente humano, en ensayos clínicos para el cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, tumores sólidos, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello y cáncer gástrico; o PDR001 (Novartis), un anticuerpo inhibidor que se une a PD-1, en ensayos clínicos para el cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de mama triple negativo y tumores sólidos avanzados o metastásicos. Tremelimumab (CP-675.206; Astrazeneca) es un anticuerpo monoclonal totalmente humano contra CTLA-4 que se ha estudiado en ensayos clínicos para varias indicaciones, incluyendo: mesotelioma, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer pancreático, cáncer de células germinales, cáncer de células

escamosas de la cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer metastásico en el hígado, cáncer de hígado, linfoma de linfocitos B grandes, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer de tiroides anaplásico metastásico, cáncer urotelial, cáncer de las trompas de Falopio, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, sarcoma de tejidos blandos y melanoma. AGEN-1884 (Agenus) es un anticuerpo anti-CTLA4 que se está estudiando en ensayos clínicos de fase 1 para tumores sólidos avanzados (NCT02694822).

En algunas realizaciones, un inhibidor de puntos de control es un inhibidor de la proteína-3 que contiene mucina de inmunoglobulina de linfocitos T (TIM-3). Los inhibidores de TIM-3 que pueden usarse en la presente invención incluyen TSR-022, LY3321367 y MBG453. TSR-022 (Tesar) es un anticuerpo anti-TIM-3 que se está estudiando en tumores sólidos (NCT02817633). LY3321367 (Eli Lilly) es un anticuerpo anti-TIM-3 que se está estudiando en tumores sólidos (NCT03099109). MBG453 (Novartis) es un anticuerpo anti-TIM-3 que se está estudiando en neoplasias malignas avanzadas (NCT02608268).

En algunas realizaciones, un inhibidor de puntos de control es un inhibidor del inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM, o TIGIT, un receptor inmunitario en determinados linfocitos T y células NK. Los inhibidores de TIGIT que pueden usarse en la presente invención incluyen BMS-986207 (Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo monoclonal anti-TIGIT (NCT02913313); OMP-313M32 (Oncomed); y anticuerpo monoclonal anti-TIGIT (NCT03119428).

En algunas realizaciones, un inhibidor de puntos de control es un inhibidor del gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3). Los inhibidores de LAG-3 que pueden usarse en la presente invención incluyen BMS-986016 y REGN3767 e IMP321. BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo anti-LAG-3, se está estudiando en glioblastoma y gliosarcoma (NCT02658981). REGN3767 (Regeneron), también es un anticuerpo anti-LAG-3 y se está estudiando en neoplasias malignas (NCT03005782). IMP321 (Immutep S.A.) es una proteína de fusión LAG-3-Ig, que se está estudiando en: melanoma (NCT02676869); adenocarcinoma (NCT02614833); y cáncer de mama metastásico (NCT00349934).

Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen agonistas de OX40. Los agonistas de OX40 que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: PF-04518600/PF-8600 (Pfizer), un anticuerpo anti-OX40 agonista, en cáncer de riñón metastásico (NCT03092856) y cánceres y neoplasias avanzadas (NCT02554812; NCT05082566); GSK3174998 (Merck), un anticuerpo anti-OX40 agonista, en ensayos de cáncer de fase 1 (NCT02528357); MEDI0562 (Medimmune/AstraZeneca), un anticuerpo anti-OX40 agonista, en tumores sólidos avanzados (NCT02318394 y NCT02705482); MEDI6469, un anticuerpo anti-OX40 agonista (Medimmune/AstraZeneca), en pacientes con cáncer colorrectal (NCT02559024), cáncer de mama (NCT01862900), cáncer de cabeza y cuello (NCT02274155) y cáncer de próstata metastásico (NCT01303705); y BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb) un anticuerpo anti-OX40 agonista, en cánceres avanzados (NCT02737475).

Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen agonistas de CD137 (también denominado 4-1BB). Los agonistas de CD137 que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: utomilumab (PF-05082566, Pfizer), un anticuerpo anti-CD137 agonista, en linfoma difuso de linfocitos B grandes (NCT02951156) y en cánceres y neoplasias avanzadas (NCT02554812 y NCT05082566); urelumab (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo anti-CD137 agonista, en melanoma y cáncer de piel (NCT02652455) y glioblastoma y gliosarcoma (NCT02658981).

Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen agonistas de CD27. Los agonistas de CD27 que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: varlilumab (CDX-1127, Celldex Therapeutics) un anticuerpo anti-CD27 agonista, en cáncer de cabeza y cuello de células escamosas, carcinoma de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de células renales y glioblastoma (NCT02335918); linfomas (NCT01460134); y glioma y astrocitoma (NCT02924038).

Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen agonistas del receptor del factor de necrosis tumoral (GITR, por sus siglas en inglés) inducido por glucocorticoides. Los agonistas de GITR que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: TRX518 (Leap Therapeutics), un anticuerpo anti-GITR agonista, en melanoma maligno y otros tumores sólidos malignos (NCT01239134 y NCT02628574); GWN323 (Novartis), un anticuerpo anti-GITR agonista, en tumores sólidos y linfoma (NCT02740270); INCAGN01876 (Incyte/Agenus), un anticuerpo anti-GITR agonista, en cánceres avanzados (NCT02697591 y NCT03126110); MK-4166 (Merck), un anticuerpo anti-GITR agonista, en tumores sólidos (NCT02132754) y MEDI1873 (Medimmune/AstraZeneca), una molécula ligando de GITR hexamérica agonista con un dominio Fc de IgG1 humana, en tumores sólidos avanzados (NCT02583165).

Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen agonistas del coestimulador de linfocitos T inducible (ICOS, también conocido como CD278). Los agonistas de ICOS que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: MEDI-570 (Medimmune), un anticuerpo anti-ICOS agonista, en linfomas (NCT02520791); GSK3359609 (Merck), un anticuerpo anti-ICOS agonista, en fase 1 (NCT02723955); y JTX-2011 (Jounce Therapeutics), un anticuerpo anti-ICOS agonista, en fase 1 (NCT02904226).

- Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen inhibidores del receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas naturales (KIR, por sus siglas en inglés). Los inhibidores de KIR que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: lirilumab (IPH2102/BMS-986015, Innate Pharma/Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo anti-KIR, en leucemias (NCT01687387, NCT02399917, NCT02481297, NCT02599649),
- 5 mieloma múltiple (NCT02252263) y linfoma (NCT01592370); IPH2101 (1-7F9, Innate Pharma) en mieloma (NCT01222286 y NCT01217203); e IPH4102 (Innate Pharma), un anticuerpo anti-KIR que se une a tres dominios de la cola citoplasmática larga (KIR3DL2), en linfoma (NCT02593045).
- Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen inhibidores de CD47 de la interacción entre CD47 y la proteína reguladora de señales alfa (SIRPa, por sus siglas en inglés). Los inhibidores de CD47/SIRPa que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: ALX-148 (Alexo Therapeutics), una variante antagonista de (SIRPa) que se une a CD47 y evita la señalización mediada por CD47/SIRPa, en fase 1 (NCT03013218); TTI-621 (SIRPa-Fc, Trillium Therapeutics), una proteína de fusión recombinante soluble creada al unir el dominio de unión a CD47 N-terminal de SIRPa con el dominio Fc de IgG1 humana, actúa al unirse al CD47
- 10 humano y evitar que suministre su señal de "no fagocitar" a los macrófagos, se encuentra en ensayos clínicos en fase 1 (NCT02890368 y NCT02663518); CC-90002 (Celgene), un anticuerpo anti-CD47, en leucemias (NCT02641002); y Hu5F9-G4 (Forty Seven, Inc.), en neoplasias colorrectales y tumores sólidos (NCT02953782), leucemia mieloide aguda (NCT02678338) y linfoma (NCT02953509).
- Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen inhibidores de CD73. Los inhibidores de CD73 que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: MEDI9447 (Medimmune), un anticuerpo anti-CD73, en tumores sólidos (NCT02503774); y BMS-986179 (Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo anti-CD73, en tumores sólidos (NCT02754141).
- Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen agonistas de la proteína estimuladora de genes de interferón (STING, también conocida como proteína transmembrana 173 o TMEM173). Los agonistas de STING que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: MK-1454 (Merck), un dinucleótido cíclico sintético agonista, en linfoma (NCT03010176); y ADU-S100 (MIW815, Aduro Biotech/Novartis), un dinucleótido cíclico sintético agonista, en fase 1 (NCT02675439 y NCT03172936).
- 30 Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen inhibidores de CSF1R. Los inhibidores de CSF1R que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen: pexidartinib (PLX3397, Plexxikon), un inhibidor de molécula pequeña CSF1R, en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cánceres metastásicos y avanzados (NCT02777710) y melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y cáncer de ovario (NCT02452424); e IMC-CS4 (LY3022855, Lilly), un anticuerpo anti-CSF-1R, en cáncer de páncreas (NCT03153410), melanoma (NCT03101254) y tumores sólidos (NCT02718911); y BLZ945 (metilamida del ácido 4-[(1R,2R)-2-hidroxyciclohexilamino]-benzotiazol-6-iloxilo]-piridin-2-carboxílico, Novartis), un inhibidor disponible por vía oral de CSF1R, en tumores sólidos avanzados (NCT02829723).
- Los inhibidores de puntos de control que pueden usarse en la presente invención incluyen inhibidores del receptor NKG2A. Los inhibidores del receptor NKG2A que se están estudiando en ensayos clínicos incluyen monalizumab (IPH2201, Innate Pharma), un anticuerpo anti-NKG2A, en neoplasias de cabeza y cuello (NCT02643550) y leucemia linfocítica crónica (NCT02557516).
- En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario se selecciona de nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab, avelumab, durvalumab, atezolizumab o pidilizumab.

Usos terapéuticos

- Los péptidos bicíclicos de la invención tienen utilidad específica como agentes de unión a Nectina-4.
- La Nectina-4 es una molécula de superficie que pertenece a la familia de proteínas nectina, que comprende 4 miembros. Las nectinas son moléculas de adhesión celular que juegan un papel clave en diversos procesos biológicos tales como la polaridad, la proliferación, la diferenciación y la migración, para células epiteliales,
- 55 endoteliales, inmunitarias y neuronales, durante el desarrollo y la vida adulta. Están implicadas en varios procesos patológicos en seres humanos. Son los principales receptores del poliovirus, virus del herpes simple y virus del sarampión. Las mutaciones en los genes que codifican la nectina-1 (PVRL1) o la Nectina-4 (PVRL4) provocan síndromes de displasia ectodérmica asociados con otras anomalías. La Nectina-4 se expresa durante el desarrollo fetal. En los tejidos adultos su expresión es más restringida que la de otros miembros de la familia. La Nectina-4 es un antígeno asociado a tumores en el 50 %, el 49 % y el 86 % de carcinomas de mama, de ovario y pulmón,
- 60 respectivamente, en su mayoría en tumores de mal pronóstico. Su expresión no se detecta en los tejidos normales correspondientes. En los tumores de mama, la Nectina-4 se expresa principalmente en carcinomas triple negativos y ERBB2+. En el suero de pacientes con estos cánceres, la detección de formas solubles de Nectina-4 se asocia con un mal pronóstico. Los niveles de Nectina-4 sérica aumentan durante la progresión metastásica y disminuyen después del tratamiento. Estos resultados sugieren que Nectina-4 podría ser una diana confiable para el tratamiento del cáncer. En consecuencia, se han descrito varios anticuerpos anti-Nectina-4 en la técnica anterior. En particular, Enfortumab

Vedotina (ASG-22ME) es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) dirigido a Nectina-4 y actualmente se investiga clínicamente para el tratamiento de pacientes que padecen tumores sólidos.

5 Los ligandos polipeptídicos seleccionados de acuerdo con el método de la presente invención pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, aplicaciones de ensayo y reactivo *in vitro* y similares. Los ligandos que tienen niveles seleccionados de especificidad son útiles en aplicaciones que implican pruebas en animales no humanos, donde la reactividad cruzada es deseable, o en aplicaciones de diagnóstico, donde la reactividad cruzada con homólogos o parálogos ha de ser controlada cuidadosamente. En algunas aplicaciones, tales como aplicaciones de vacuna, la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria a intervalos predeterminados de antígenos puede ser aprovechada para adaptar una vacuna a enfermedades y patógenos específicos.

15 Los ligandos peptídicos sustancialmente puros de al menos el 90 al 95 % de homogeneidad son los preferidos para la administración a un mamífero, y del 98 al 99 % o más de homogeneidad es lo más preferido para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los polipéptidos seleccionados pueden usarse de manera diagnóstica o terapéutica (incluso de forma extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) Immunological Methods, Volúmenes I y II, Academic Press, NY).

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un ligando peptídico o un conjugado de fármaco como se define en el presente documento, para su uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por Nectina-4.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco como se define en el presente documento para su uso en un método de prevención, supresión o tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por Nectina-4, en donde dicho método comprende administrar a un paciente que lo necesita un grupo efector y un conjugado de fármaco del ligando peptídico como se define en el presente documento.

30 En una realización, la Nectina-4 es la Nectina-4 de mamíferos. En una realización adicional, la Nectina-4 de mamíferos es la Nectina-4 humana.

En una realización, la enfermedad o trastorno mediado por Nectina-4 se selecciona de infecciones víricas, síndromes de displasia ectodérmica y otras anomalías, carcinomas de mama, ovario y pulmón, progresión metastásica y tumores sólidos.

35 En una realización adicional, la enfermedad o trastorno mediado por Nectina-4 se selecciona de cáncer.

Los ejemplos de cánceres (y sus equivalentes benignos) que pueden tratarse (o inhibirse) incluyen, pero no se limitan a tumores de origen epitelial (adenomas y carcinomas de diversos tipos incluyendo adenocarcinomas, carcinomas escamosos, carcinomas de células transicionales y otros carcinomas) tales como carcinomas de vejiga y tracto urinario, mama, tracto gastrointestinal (incluyendo el esófago, estómago (gástrico), intestino delgado, colon, recto y ano), hígado (carcinoma hepatocelular), vesícula biliar y sistema biliar, páncreas exocrino, riñón, pulmón (por ejemplo, adenocarcinomas, carcinomas pulmonares microcíticos, carcinomas pulmonares no microcíticos, carcinomas bronquioalveolares y mesoteliomas), cabeza y cuello (por ejemplo, cánceres de lengua, cavidad bucal, laringe, faringe, nasofaringe, amígdala, glándulas salivales, cavidad nasal y senos paranasales), ovario, trompas de Falopio, peritoneo, vagina, vulva, pene, cuello uterino, miometrio, endometrio, tiroides (por ejemplo, carcinoma folicular de tiroides), suprarrenal, próstata, piel y anexos (por ejemplo, melanoma, carcinoma basocelular, carcinoma escamocelular, queratoacantoma, nevo displásico); neoplasias hematológicas (es decir, linfomas) y trastornos hematológicos preneoplásicos y trastornos de bajo potencial neoplásico, incluyendo neoplasias hematológicas y afecciones relacionadas del linaje linfoide (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda [ALL], leucemia linfocítica crónica [CLL], linfomas de linfocitos B, tales como linfoma difuso de linfocitos B grandes [DLBCL], linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto, linfomas y leucemias de linfocitos T, linfomas de linfocitos citolíticos naturales [NK], linfomas de Hodgkin, leucemia de células pilosas, gamopatía monoclonal de significado incierto, plasmacitoma, mieloma múltiple y trastornos linfoproliferativos postrasplante), y neoplasias hematológicas y afecciones relacionadas de linaje mieloide (por ejemplo, leucemia mieloide aguda [AML], leucemia mieloide crónica [CML], leucemia mielomonocítica crónica [CMML], síndrome hipereosinofílico, trastornos mieloproliferativos tales como policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria, síndrome mieloproliferativo, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica); tumores de origen mesenquimal, por ejemplo, sarcomas de tejido blando, hueso o cartílago, tales como osteosarcomas, fibrosarcomas, condrosarcomas, rabdomiosarcomas, leiomiomas, liposarcomas, angiosarcomas, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Ewing, sarcomas sinoviales, sarcomas epitelioides, tumores del estroma gastrointestinal, histiocitomas benignos y malignos y dermatofibrosarcoma protuberans; tumores del sistema nervioso central o periférico (por ejemplo, astrocitomas, gliomas y glioblastomas, meningiomas, ependimomas, tumores pineales y schwannomas); tumores endocrinos (por ejemplo, tumores pituitarios, tumores suprarrenales, tumores de células de los islotes, tumores paratiroideos, tumores carcinoides y carcinoma medular de la tiroides); tumores oculares y anexiales (por ejemplo, retinoblastoma); tumores de células germinales y trofoblásticos (por ejemplo, teratomas, seminomas, disgerminomas, molas hidatiformes y coriocarcinomas); y tumores pediátricos y

embrionarios (por ejemplo, meduloblastoma, neuroblastoma, tumor de Wilms y tumores neuroectodérmicos primitivos); o síndromes, congénitos o de otro tipo, que dejan al paciente susceptible a la malignidad (por ejemplo, xeroderma pigmentoso).

- 5 En una realización adicional, el cáncer se selecciona de una neoplasia maligna hematopoyética tal como seleccionada de: linfoma no Hodgkin (LNH), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL) B y T, linfoma de linfocitos T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), tricoleucemia (HCL), linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML).
- 10 En una realización adicional más, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de vejiga, cáncer de páncreas y cáncer de mama. En el presente documento se presentan datos en los Ejemplos 1 a 5 que demuestran que los conjugados de fármacos bicíclicos seleccionados de la invención exhibieron actividad antitumoral en estos modelos de cáncer.
- 15 Las referencias en el presente documento al término "prevención" implican la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" se refiere a la administración de la composición después de un acontecimiento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que se manifiesten los síntomas de la enfermedad.
- 20 Están disponibles sistemas de modelos animales que pueden usarse para evaluar la eficacia de los ligandos peptídicos en la protección contra la enfermedad o en el tratamiento de la misma. La presente invención facilita el uso de sistemas de modelos animales, que permite el desarrollo de ligandos polipeptídicos que pueden reaccionar de forma cruzada con dianas humanas y animales, para permitir el uso de modelos animales.
- 25 Adicionalmente, se presentan datos que demuestran una asociación entre la variación del número de copias (CNV) y la expresión genética de Nectina-4 en múltiples tipos de tumores. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco como se define en el presente documento para su uso en un método de prevención, supresión o tratamiento de cáncer, en donde dicho método comprende administrar a un paciente que lo necesita un grupo efector y un conjugado de fármaco del ligando peptídico como se define en el presente documento, en donde se identifica que dicho paciente tiene una variación aumentada del número de copias (CNV) de Nectina-4.
- 30 En una realización, el cáncer se selecciona de aquellos identificados en el presente documento por tener un CNV aumentado de Nectina-4. En una realización adicional, el cáncer se selecciona de aquellos identificados en el presente documento por tener un CNV aumentado de Nectina-4, en concreto: mama, útero, vejiga, adenocarcinoma de pulmón, escamoso pulmonar, cervicouterino, cabeza y cuello, pancreático, tiroides, colorrectal, timoma, sarcoma, carcinoma de células renales (RCC), próstata y estómago.
- 35 En una realización, el cáncer se selecciona de aquellos identificados en el presente documento por tener un CNV aumentado de Nectina-4, en concreto: mama, útero, vejiga, adenocarcinoma de pulmón, escamoso pulmonar, cervicouterino, cabeza y cuello, pancreático, tiroides, colorrectal, timoma, sarcoma, carcinoma de células renales (RCC), próstata y estómago.

La invención se describe con más detalle a continuación con referencia a los siguientes ejemplos.

40

Ejemplos

Abreviaturas

1,2,4-TriAz	3-(1,2,4-Triazol-1-il)-alanina
1Nal	1-Naftilalanina
2FuAla	2-Furilalanina
2MePhe	2-Metil-Fenilalanina
2Nal	2-Naftilalanina
2Pal	2-Piridilalanina
3,3-DPA	3,3-Difenilalanina
3MePhe	3-Metil-Fenilalanina
3Pal	3-Piridilalanina
4,4-BPA	4,4-Bifenilalanina
4,4-DFP	4,4-Difluoroprolina
4MePhe	4-Metil-Fenilalanina
4Pal	4-Piridilalanina
4ThiAz	Beta-(4-Tiazolil)-Alanina
5FTrp	5-Fluoro-L-triptófano
Agb	Ácido 2-amino-4-guanidinobutírico
Aib	Ácido aminoisobutírico
AzaTrp	Azatriptófano
Aze	Azetidina
C5A	Ciclopentil glicina
Cha	3-Ciclohexil-alanina
Cpa	Ciclopropilalanina

Cya	Ácido cistéico
DOPA	3,4-Dihidroxi-fenilalanina
HArg	HomoArginina
HGln	HomoGlutamina
Hleu	HomoLeucina
Hphe	HomoFenilalanina
Hse(me)	Homoserina(Me)
HSer	HomoSerina
HyP	Hidroxiprolina
Lys(Ac)	Lisina(Acetilo)
Met(O2)	Metionina sulfona
Nle	Norleucina
Oic	Ácido octahidroindolcarboxílico
Oxa	Ácido oxazolidina-4-carboxílico
pCoPhe	para-Carboxi-Fenilalanina
PheOPhe	4-Fenoxi-fenilalanina
Phg	Fenilglicina
Pip	Ácido pipecólico
Pro(4NH)	4-Amino-Prolina
tBuAla	t-Butil-Alanina
TetraZ	Tetrazol Alanina
Thi	Tienil-alanina
THP(O)	Ácido tetrahidropiran-4-propanoico
THP(SO2)	Ácido dioxo-4-tetrahidrotiopiranilacético
Trp(Me)	Metil triptófano

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos

5 La síntesis de péptidos se basó en la química Fmoc, usando un sintetizador de péptidos Symphony fabricado por Peptide Instruments y un sintetizador Syro II de MultiSynTech. Se emplearon aminoácidos Fmoc convencionales (Sigma, Merck), con grupos protectores de cadena lateral apropiados: cuando procedía, se usaban en cada caso las condiciones de acoplamiento convencionales, seguido de desprotección usando la metodología convencional.

10 Como alternativa, los péptidos se purificaron mediante HPLC y, tras su aislamiento, se modificaron con 1,3,5-triacriloxihexahidro-1,3,5-triazina (TATA, Sigma). Para esto, el péptido lineal se diluyó con MeCN:H₂O 50:50 hasta ~35 ml, se añadieron ~500 µl de TATA 100 mM en acetonitrilo y la reacción se inició con 5 ml de NH₄HCO₃ 1 M en H₂O. Se dejó que la reacción continuara durante ~30-60 min a TA y se liofilizó una vez que la reacción se completó (a juzgar por MALDI). Una vez completado, se añadió 1 ml de clorhidrato de L-cisteína monohidrato 1 M (Sigma) en H₂O a la reacción durante ~60 min a TA para inactivar cualquier exceso de TATA. Después de la liofilización, el péptido modificado se purificó como se indicó anteriormente, mientras reemplaza la columna Luna C8 con una columna Gemini C18 (Phenomenex) y cambia el ácido a ácido trifluoroacético al 0,1 %. Las fracciones puras que contenían el material modificado con TATA correcto se agruparon, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C para su almacenamiento.

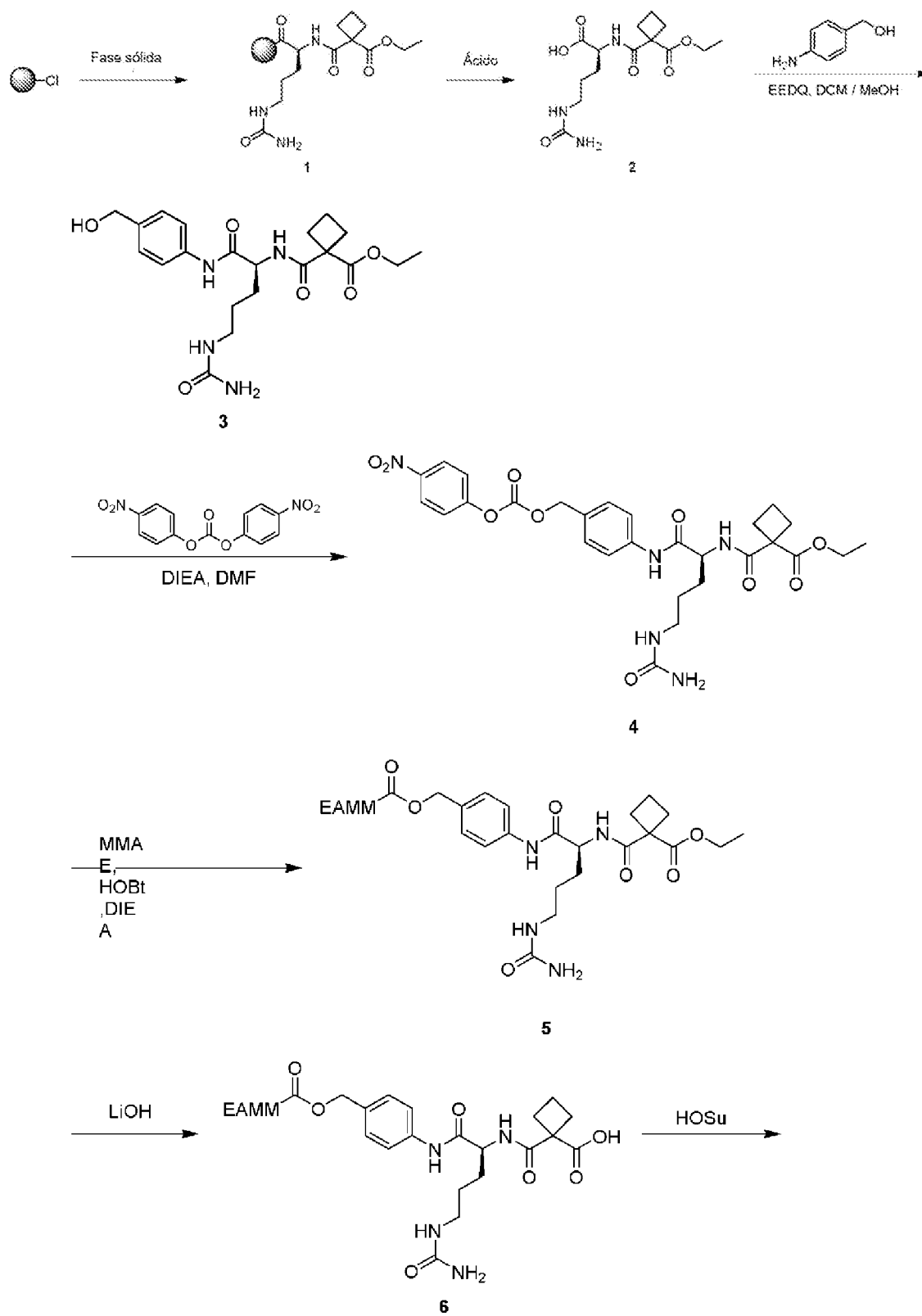
20 Todos los aminoácidos, a menos que se indique de otro modo, se usaron en las configuraciones L.

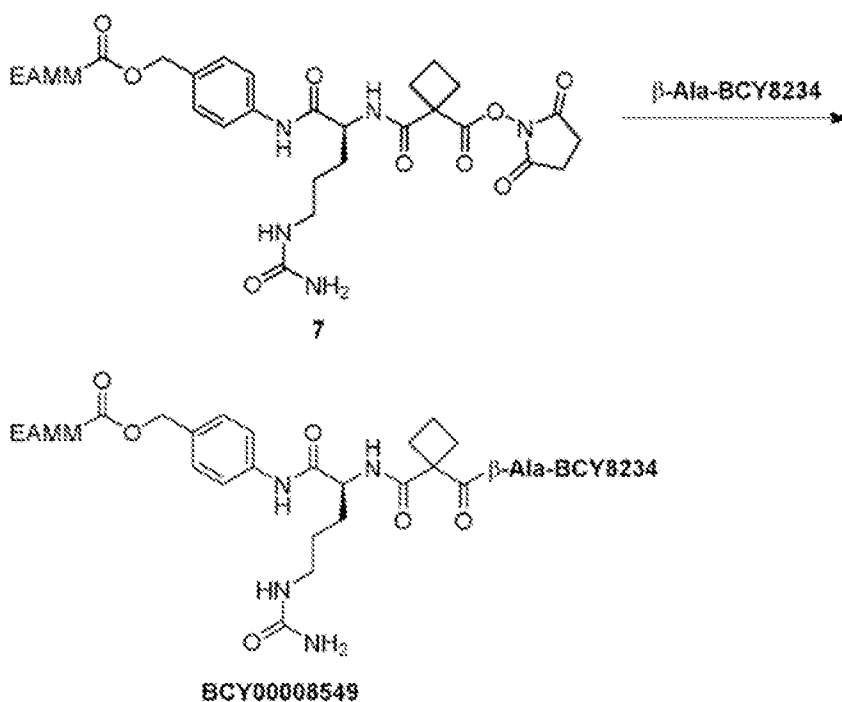
En algunos casos los péptidos se convierten en disulfuros activados antes de acoplarse con el grupo tiol libre de una toxina usando el siguiente método; se añadió una solución de 4-metil(succinimidilo 4-(2-piridiltio)pentanoato) (100 mM) en DMSO seco (1,25 mol equiv) a una solución de péptido (20 mM) en DMSO seco (1 mol equiv). La reacción se mezcló bien y se añadió DIPEA (20 mol equiv). La reacción se controló mediante CL/EM hasta su finalización.

Preparación de conjugados de fármacos y péptidos bicíclicos

Preparación de BCY8549

30 Condición de separación: Fase A: TFA al 0,075 % en H₂O, Fase B: MeCN
Método de separación: 18-48-55 min, TR = 53,5 min
Columna de separación: Luna 200*25 mm 10 µm, C18, 110A y Gemin150*30 mm, C18, 5 µm, 110A, conexión, 50 °C
35 Método de disolución: DMF
Pureza de separación: 95 %
BCY8234 se sintetizó mediante síntesis en fase sólida.





Preparación del compuesto 2

5 El péptido se sintetizó usando la química Fmoc convencional.

- 1) Añadir DCM al recipiente que contiene resina CTC (5 mmol, 4,3 g, 1,17 mmol/g) y Fmoc-Cit -OH (2,0 g, 5 mmol, 1,0 eq) con N₂ burbujeante.
- 2) Añadir DIEA (4,0 eq) gota a gota y mezclar durante 2 horas.
- 3) Añadir MeOH (5 ml) y mezcle durante 30 min.
- 4) Escurrir y lavar con DMF 5 veces.
- 5) Añadir piperidina/DMF al 20 % y hacer reaccionar durante 30 min.
- 6) Escurrir y lavar con DMF 5 veces.
- 7) Añadir la solución de aminoácido Fmoc y mezclar durante 30 segundos, a continuación añadir el tampón de activación, burbujeando N₂ durante aproximadamente 1 hora.
- 8) Repetir las etapas 4 a 7 anteriores para el acoplamiento de los siguientes aminoácidos.

Nota:

N.º	Materiales	Reactivos de acoplamiento
1	Fmoc-Cit-OH (1,0 eq)	DIEA (4,0 eq)
2	ácido 1-etoxycarbonilciclobutanocarboxílico (3,0 eq)	HATU (2,85 eq) y DIEA (6,0 eq)

Se usó piperidina al 20 % en DMF para la desprotección de Fmoc durante 30 minutos. La reacción de acoplamiento se controló mediante la prueba de ninhidrina y la resina se lavó con DMF 5 veces.

Escisión y purificación de péptidos:

- 1) Añadir tampón de escisión (TFIP al 20 %/DCM al 80 %) al matraz que contiene el péptido protegido de la cadena lateral a temperatura ambiente y agitar durante 1 hora dos veces.
- 2) Filtrar y recoger el filtrado.
- 3) Concentrar para eliminar el disolvente.
- 4) El péptido bruto se liofilizó para obtener el producto final (1,4 g, rendimiento del 85,0 %).

Preparación del compuesto 3

A una solución del compuesto 2 (1,65 g, 5,01 mmol, 1,0 eq) en DCM (30 ml) y MeOH (15 ml) se añadió EEDQ (2,48 g, 10,02 mmol, 2,0 eq) y (4-aminofenil)metanol (740,37 mg, 6,01 mmol, 1,2 eq). La mezcla se agitó a 15 °C durante 16 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto 2 se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal

con la m/z deseada. La TLC indicó que el compuesto 2 se consumió por completo y se formaron muchas manchas nuevas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; Columna ultrarrápida de sílice 80 SepaFlash®, Eluyente de gradiente 0-15 DCM/MeOH a 60 ml/min). El compuesto 3 (1,3 g, 2,99 mmol, rendimiento del 59,72 %) se obtuvo como un sólido amarillo.

Preparación del compuesto 4

A una solución del compuesto 3 (1,3 g, 2,99 mmol, 1,0 eq) en DMF (10 ml) se añadió DIEA (2,32 g, 17,95 mmol, 3,13 ml, 6,0 eq) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (3,64 g, 11,97 mmol, 4,0 eq). La mezcla se agitó a 15 °C durante 1 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto 3 se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. El residuo se purificó mediante HPLC prep (condición neutra). El compuesto 4 (1,0 g, 1,67 mmol, rendimiento del 55,74 %) se obtuvo como un sólido amarillo.

Preparación del compuesto 5

A una solución de compuesto 5 (250,53 mg, 417,84 μ mol, 1,5 eq) en DMF (5 ml), se le añadieron HOBt (56,46 mg, 417,84 μ mol, 1,5 eq) y DIEA (108,01 mg, 835,68 μ mol, 145,56 μ l, 3,0 eq), MMAE (0,200 g, 278,56 μ mol, 1,0 eq). La mezcla se agitó a 35 °C durante 12 horas. El análisis por CL-EM mostró que MMAE se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. La reacción se purificó mediante HPLC prep (condición neutra). El compuesto 5 (0,180 g, 152,74 μ mol, rendimiento del 54,83 %) se obtuvo como un sólido amarillo.

Preparación del compuesto 6

A una solución de compuesto 5 (0,170 g, 144,26 μ mol, 1,0 eq) en THF (5 ml) y H₂O (5 ml) se añadió LiOH·H₂O (12,11 mg, 288,51 μ mol, 2,0 eq). La mezcla se agitó a 15 °C durante 1 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto 5 se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. Se usó pH = 7 ajustado por AcOH y THF se eliminó a presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante HPLC prep (condición neutra). El compuesto 6 (0,185 g, bruto) se obtuvo como un sólido amarillo.

Preparación de BCY8549

A una solución de compuesto 6 (0,100 g, 86,93 μ mol, 1,0 eq) en DMA (4 ml) se le añadieron HOSu (10,00 mg, 86,93 μ mol, 1,0 eq) y EDCI (16,66 mg, 86,93 μ mol, 1,0 eq). Después de formarse el éster NHS, β -Ala-BCY8234 (525,98 mg, 173,85 μ mol, 2,0 eq) y DIEA (33,70 mg, 260,78 μ mol, 45,42 μ l, 3,0 eq). La mezcla se agitó a 15 °C durante 4 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto 6 se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. La reacción se purificó mediante HPLC prep (condición TFA). El compuesto **BCY8549** (0,0528 g, 12,15 μ mol, rendimiento del 13,98 %, pureza del 95,70 %) se obtuvo como un sólido blanco. Tiempo de retención = 11,48 min. Masa encontrada = 1386,4 (M/3+H)

Preparación de BCY8245

Condición de separación: Fase A: TFA al 0,075 % en H₂O, Fase B: MeCN

Método de separación: 18-48-55 min, TR = 53,5 min

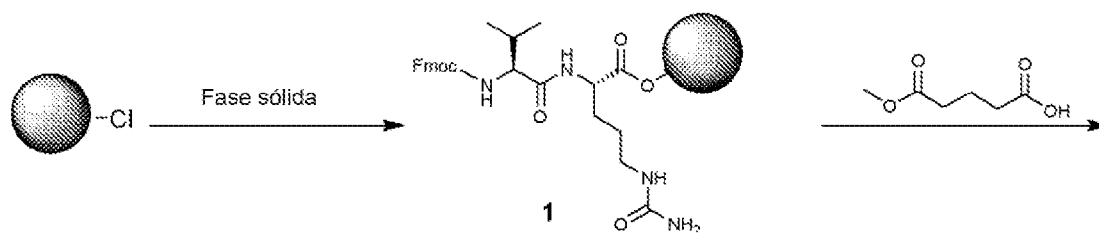
Columna de separación: Luna 200*25 mm 10 μ m, C18, 110A y Gemin150*30 mm, C18, 5 μ m, 110A, conexión, 50 °C

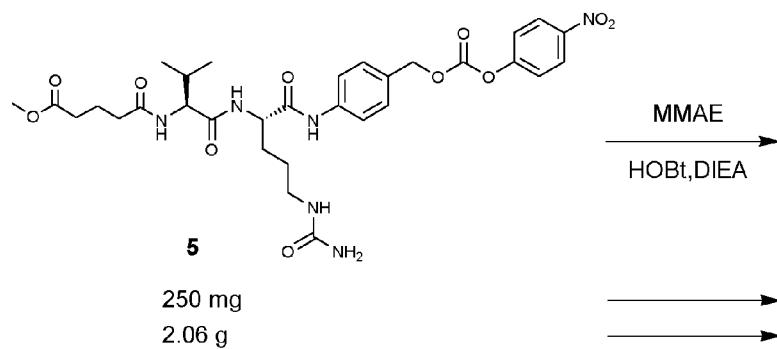
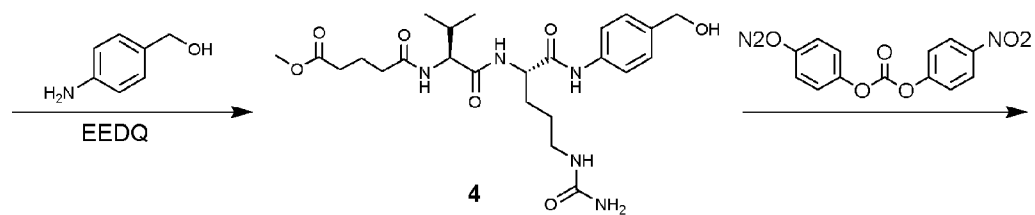
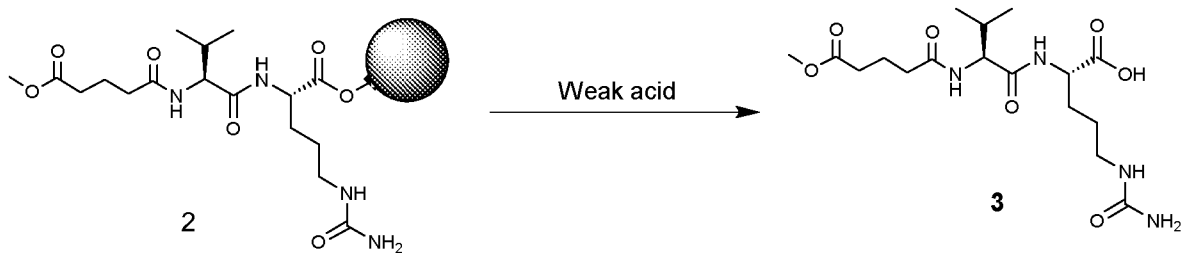
Método de disolución: DMF

Pureza de separación: 95 %

El BCY8234 se sintetizó mediante síntesis en fase sólida.

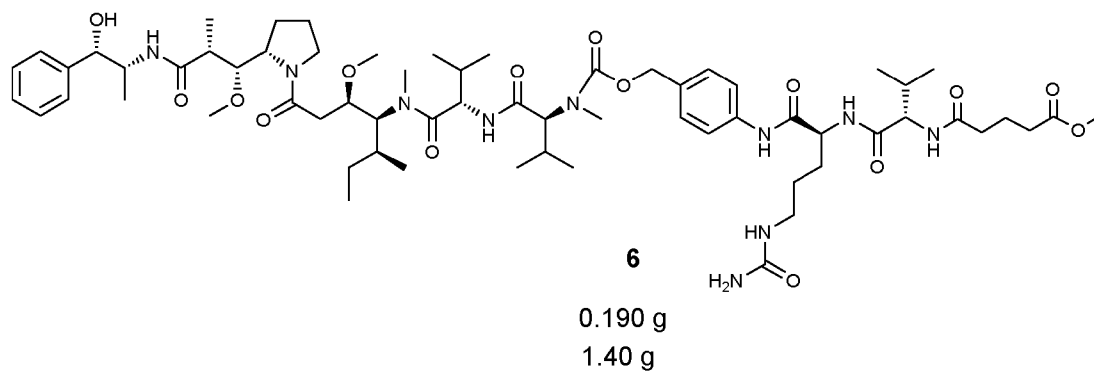
El esquema de reacción de BCY8245 se muestra a continuación:





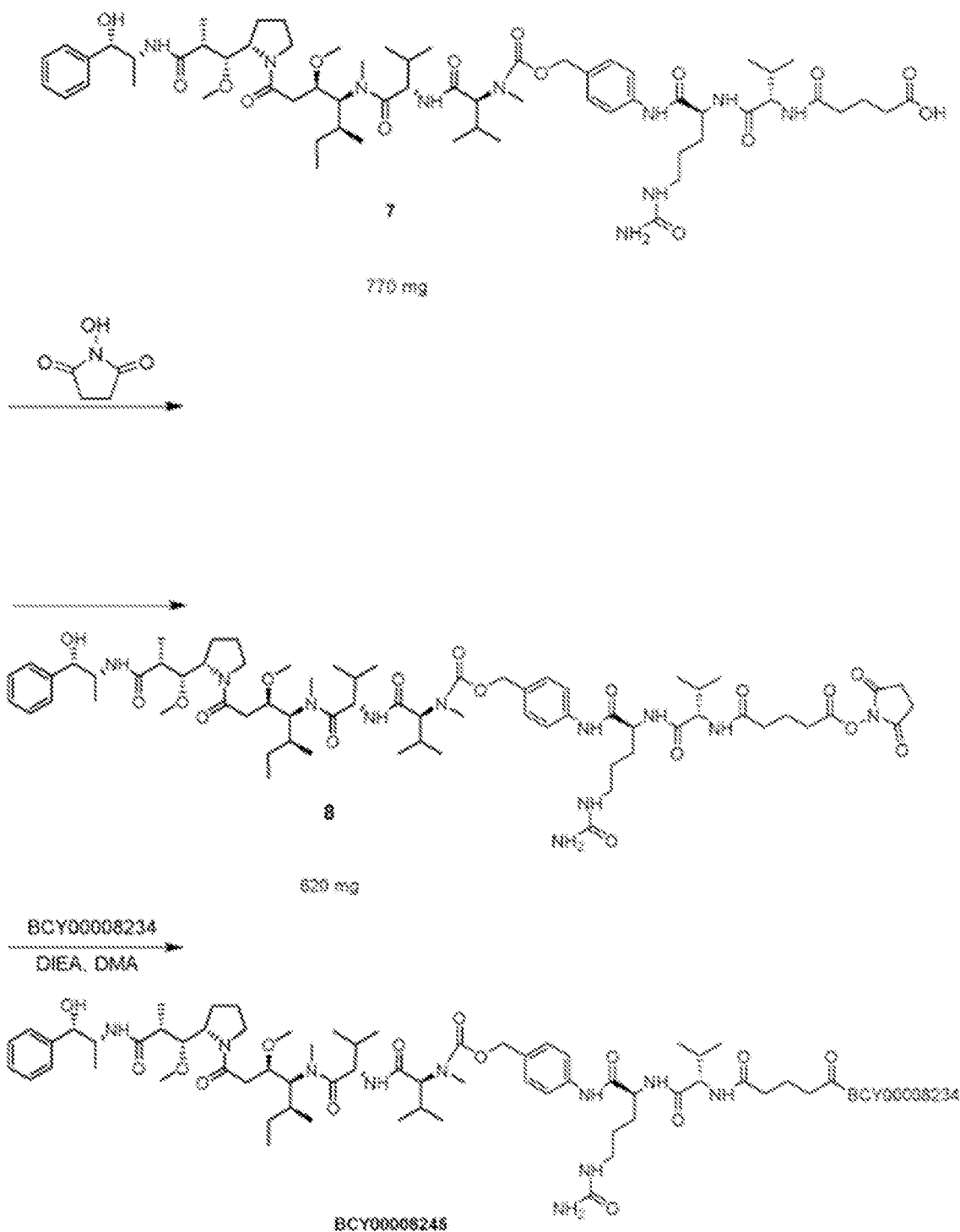
250 mg
2.06 g

5



0.190 g
1.40 g

LiOH



Preparación del compuesto 3

- 5 El compuesto **3** se sintetizó mediante el método en fase sólida.

Preparación del compuesto 4

- 10 A una solución de compuesto **3** (1,3 g, 3,23 mmol, 1,0 eq) en DCM (10 ml) y MeOH (5 ml) se añadió EEDQ (1,60 g, 6,46 mmol, 2,0 eq) y (4-aminofenil)metanol (517,16 mg, 4,20 mmol, 1,3 eq). La mezcla se agitó a 20 °C durante 16 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto **3** se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la *m/z* deseada. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice de 40 g SepaFlash®, Eluyente de gradiente 0-15 % DCM/MeOH a 40 ml/min). El compuesto **4** (0,950 g, 1,87 mmol, rendimiento del 57,94 %) se obtuvo como un sólido amarillo.
- 15

Preparación del compuesto 5

A una solución del compuesto **4** (0,950 g, 1,87 mmol, 1,0 eq) en DMF (5 ml) se añadió DIEA (1,21 g, 9,36 mmol, 1,63 ml, 5,0 eq) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,28 g, 7,49 mmol, 4,0 eq). La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto **4** se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. La reacción se purificó mediante HPLC prep (condición neutra). El compuesto **5** (0,400 g, 594,64 µmol, rendimiento del 31,77 %) se obtuvo como un sólido blanco.

Preparación del compuesto 6

A una solución de compuesto **5** (0,200 g, 297,32 µmol, 1,0 eq) en DMF (5 ml), se le añadieron HOBt (52,23 mg, 386,51 µmol, 1,3 eq) y DIEA (115,28 mg, 891,95 µmol, 155,36 µl, 3,0 eq), MMAE (192,12 mg, 267,59 µmol, 0,9 eq). La mezcla se agitó a 20 °C durante 16 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto **5** se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. La reacción se purificó mediante HPLC prep (condición neutra). El compuesto **6** (0,160 g, 127,84 µmol, rendimiento del 43,00 %) se obtuvo como un sólido blanco.

Preparación del compuesto 7

A una solución de compuesto **6** (0,160 g, 127,84 µmol, 1,0 eq) en THF (3 ml) y H₂O (3 ml) se añadió LiOH·H₂O (26,82 mg, 639,21 µmol, 5,0 eq). La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto **6** se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. El THF se eliminó a presión reducida y se ajustó el pH=7 mediante AcOH, la mezcla se liofilizó. El compuesto **7** (0,130 g, 105,05 µmol, rendimiento del 82,17 %) se obtuvo como un sólido blanco.

Preparación del compuesto 8

A una solución de compuesto **7** (36,27 mg, 315,15 µmol, 3,0 eq) en DMA (6 ml) y DCM (2 ml) se añadió EDCI (60,41 mg, 315,15 µmol, 3,0 eq). La mezcla se agitó a 15 °C durante 3 h. El análisis por CL-EM mostró que el compuesto **7** se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada. El DCM se eliminó a presión reducida. La reacción se purificó mediante HPLC prep (condición neutra). El compuesto **8** (0,095 g, 71,18 µmol, rendimiento del 67,76 %) se obtuvo como un sólido blanco.

Preparación de BCY8245

A una solución de **BCY8234** (66,41 mg, 22,48 µmol, 1,0 eq) en DMA (4 ml) se añadieron DIEA (8,72 mg, 67,44 µmol, 11,75 µl, 3,0 eq) y compuesto **8** (0,030 g, 22,48 µmol, 1,0 eq). La mezcla se agitó a 20 °C durante 16 h. El análisis por CL-EM mostró que BCY8234 se había consumido por completo, y se detectó un máximo principal con la m/z deseada o la masa deseada. La reacción se purificó mediante HPLC prep (condición TFA). El compuesto **BCY8245** (0,0427 g, 10,16 µmol, rendimiento del 45,19 %, pureza del 99,30 %) se obtuvo como un sólido blanco. Tiempo de retención = 11,7 min. Masa encontrada = 1043,9 (M/4+H)

DATOS BIOLÓGICOSEnsayo de unión directa de Nectina-4

La afinidad de los péptidos de la invención por la Nectina-4 humana (Ki) se determinó usando un ensayo de polarización de fluorescencia, de acuerdo con los métodos desvelados en el documento WO 2016/067035. Los péptidos de la invención con una etiqueta fluorescente (ya sea fluoresceína, SIGMA o Alexa Fluor488™, Fisher Scientific) se diluyeron a 2,5 nM en PBS con tween 20 al 0,01 % o HEPES 50 mM con NaCl 100 mM tween al 0,01 % pH 7,4 (ambos denominados tampón de ensayo). Esto se combinó con una titulación de proteína en el mismo tampón de ensayo que el péptido para dar 1 nM de péptido en un volumen total de 25 µl en unas placas de 384 pocillos de pared y fondo negros, de baja unión y bajo volumen, normalmente 5 µl de tampón de ensayo, 10 µl de proteína a continuación 10 µl de péptido fluorescente. Se usaron una de cada dos diluciones seriadas para obtener 12 concentraciones diferentes con concentraciones máximas que variaban de 500 nM para proteínas de unión de alta afinidad conocidas a 10 µM para proteínas de unión de baja afinidad y ensayos de selectividad. Las mediciones se llevaron a cabo en un BMG PHERAstar FS equipado con un módulo óptico "FP 485 520 520" que excita a 485 nm y detecta emisión paralela y perpendicular a 520 nm. El PHERAstar FS se ajustó a 25 °C con 200 destellos por pocillo y un retraso de posicionamiento de 0,1 segundos, medido cada pocillo medido a intervalos de 5 a 10 minutos durante 60 minutos. La ganancia usada para el análisis se determinó para cada trazador al final de los 60 minutos donde no había proteína en el pocillo. Los datos se analizaron usando Systat Sigmaplot versión 12.0. Los valores de mP se ajustaron a una ecuación cuadrática definida por el usuario para generar un valor Kd: $f = y_{min} + (y_{max} - y_{min}) / \text{Lig} * ((x + \text{Lig} + Kd) / 2 - \sqrt{((x + \text{Lig} + Kd) / 2)^2 - (\text{Lig} * x)})$. "Lig" era un valor definido de la concentración del trazador usado.

Ensayo de unión competitiva de Nectina-4

Los péptidos sin una etiqueta fluorescente se probaron en competición con ACPFGCHTDWSWPIWCA-Sar6-K(FI) (SEQ ID NO: 2) y ($K_d = 5 \text{ nM}$ - determinado usando el protocolo anterior). Los péptidos se diluyeron a una concentración adecuada en el tampón de ensayo como se describe en el ensayo de unión directa con un máximo de DMSO al 5 %, a continuación se diluye en serie 1 en 2. Se añadieron cinco μl de péptido diluido a la placa seguido de 10 μl de Nectina-4 humana, a continuación se añadieron 10 μl de péptido fluorescente. Las mediciones se llevaron a cabo como para el ensayo de unión directa, sin embargo, la ganancia se determinó antes de la primera medición. El análisis de datos se realizó en Systat Sigmaplot versión 12.0, donde los valores de mP se ajustaron a una ecuación cúbica definida por el usuario para generar un valor K_i :

$$f = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \text{Lig} * ((2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^2 - 0.5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3 - 0.5))) / 3)) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c))) / ((3 * \text{Klig}) + ((2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^2 - 0.5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3 - 0.5))) / 3)) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c))))$$

"Lig", "Klig" y "Prot" eran todos valores definidos relacionados con: concentración de péptido fluorescente, la K_d del péptido fluorescente y la concentración de Nectina respectivamente.

Ensayo de unión SPR Biacore de Nectina-4

Se realizaron experimentos de Biacore para determinar los valores k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (nM) de péptidos monoméricos que se unen a la proteína Nectina-4 humana (obtenida de Charles River).

La Nectina-4 humana (restos Gly32-Ser349; RefSeq del NCBI: NP_112178.2) con una secuencia señal gp67 y una etiqueta FLAG C-terminal se clonó en pFastbac-1 y baculovirus elaborado usando protocolos Bac-to-Bac™ (Life Technologies). Las células Sf21 a $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ en medio Excell-420 (Sigma) a 27°C se infectaron a una MOI de 2 con una solución madre de virus P1 y el sobrenadante se recogió a las 72 horas. El sobrenadante se unió por lotes durante 1 hora a 4°C con resina de agarosa de afinidad Anti-FLAG M2 (Sigma) lavada en PBS y la resina posteriormente se transfirió a una columna y se lavó exhaustivamente con PBS. La proteína se eluyó con 100 $\mu\text{g/ml}$ de péptido FLAG. La proteína eluida se concentró a 2 ml y se cargó en una columna S-200 Superdex (GE Healthcare) en PBS a 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 2 ml y las fracciones que contenían proteína Nectina-4 se concentraron a 16 mg/ml.

La proteína se biotiniló aleatoriamente en PBS usando reactivo EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotina (Thermo Fisher) según el protocolo sugerido por el fabricante. La proteína se desalinizó exhaustivamente para eliminar la biotina desacoplada usando columnas de centrifugación en PBS.

Para el análisis de la unión de péptidos, se usó un instrumento Biacore 3000 utilizando un chip CM5 (GE Healthcare). La estreptavidina se inmovilizó en el chip usando química de acoplamiento de amina convencional a 25°C con HBS-N (HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) como tampón de ejecución. Brevemente, la superficie de carboximetildextrano se activó con una inyección de 7 minutos de una relación 1:1 de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0,4 M/N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M a un caudal de 10 $\mu\text{l/min}$. Para la captura de estreptavidina, la proteína se diluyó a 0,2 mg/ml en acetato sódico 10 mM (pH 4,5) y se capturó inyectando 120 μl de estreptavidina sobre la superficie del chip activado. Los grupos activados residuales se bloquearon con una inyección de 7 minutos de etanolamina 1 M (pH 8,5) y la Nectina-4 biotinilada se capturó a un nivel de 1.200-1.800 UR. El tampón se cambió a PBS/Tween 20 al 0,05 % y se preparó una serie de diluciones de los péptidos en este tampón con una concentración final de DMSO del 0,5 %. La concentración superior de péptido fue de 100 nM con 6 diluciones adicionales de 2 veces. El análisis SPR se realizó a 25°C a un caudal de 50 $\mu\text{l/min}$ con 60 segundos de asociación y una disociación entre 400 y 1.200 segundos dependiendo del péptido individual. Los datos se corrigieron para determinar los efectos de volumen excluidos del DMSO. Se hizo referencia a todos los datos dos veces para las inyecciones en blanco y la superficie de referencia usando procedimientos de procesamiento estándar, y el procesamiento de datos y el ajuste cinético se realizaron usando el programa informático Scrubber, versión 2.0c (BioLogic Software). Los datos se ajustaron usando un modelo de unión simple 1:1 que permite efectos de transporte de masa cuando es apropiado.

Determinados ligandos peptídicos de la invención se ensayaron en los ensayos de unión de Nectina-4 mencionados anteriormente y los resultados se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Datos de unión de competición para ligandos peptídicos seleccionados de la invención

N.º de biciclo	K _i (µM)	Número de experimentos
BCY8122	0,003	2
BCY8126	0,0027	6

Determinados péptidos bicíclicos de la invención se ensayaron en el ensayo SPR mencionado anteriormente y los resultados se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Datos SPR para ligandos peptídicos seleccionados de la invención

N.º de biciclo	K _d de SPR humano (nM)	n
BCY8122	0,89	1
BCY8126	1,07	4
BCY8116	0,372	1
n = número medio de experimentos		

Determinados péptidos bicíclicos de la invención se conjugaron con agentes citotóxicos y se ensayaron en el ensayo SPR mencionado anteriormente y los resultados se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3: Datos SPR para BDC seleccionados de la invención

N.º de conjugado de fármaco bicíclico (BDC)	Péptido	K _d de SPR humano (nM)
BCY8245	MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaril-BCY8234	5,12 (n = 4)
BCY8549	MMAE-PABC-ciclobutil-(B-Ala)-BCY8234	1,44 (n = 1)

Estudios in vivo

En cada uno de los Ejemplos 1 a 5 y 9 se adoptó la siguiente metodología para cada estudio:

Artículos de prueba y control positivo

Número	Descripción física	Peso molecular	Pureza	Condiciones de almacenamiento
BCY8245	Polvo liofilizado	4173,85	99,60 %	almacenado a -80 °C
BCY8549	Polvo liofilizado	4157,81	95,70 %	almacenado a -80 °C

Métodos y procedimientos experimentales

(i) Observaciones

Todos los procedimientos relacionados con el manejo de animales, el cuidado y el tratamiento en el estudio se realizaron de acuerdo con las pautas aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de WuXi AppTec, siguiendo la orientación de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). En el momento del seguimiento de rutina, se comprobó diariamente en los animales cualquier efecto del crecimiento del tumor y los tratamientos sobre la conducta normal tales como movilidad, consumo de alimentos y agua (solo mirando), aumento/pérdida de peso corporal, enmarañamiento de ojos y cabello y cualquier otro efecto anormal según lo indicado en el protocolo. La muerte y los signos clínicos observados se registraron en función del número de animales dentro de cada subconjunto.

(ii) Mediciones del tumor y criterios de valoración

El criterio de valoración principal era ver si se podía retrasar el crecimiento del tumor o curar a los ratones. El volumen tumoral se midió tres veces a la semana en dos dimensiones usando un calibre y el volumen se expresó en mm³ usando la fórmula: $V = 0,5 a \times b^2$ donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. A continuación el tamaño tumoral se usó para los cálculos de los valores de T/C. El valor de T/C (en porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral; T y C son los volúmenes medios de los grupos tratados y de control, respectivamente, en un día dado.

TGI se calculó para cada grupo usando la fórmula: $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$; T_i es el volumen tumoral promedio de un grupo de tratamiento en un día dado, T_0 es el volumen tumoral promedio del grupo de tratamiento el día del inicio del tratamiento, V_i es el volumen tumoral promedio del grupo de control de vehículo el mismo día que T_i y V_0 es el volumen tumoral promedio del grupo de vehículo el día del inicio del tratamiento.

(iii) Análisis estadístico

La estadística de resumen, incluyendo la media y el error típico de la media (SEM), se proporcionan para el volumen tumoral de cada grupo en cada punto temporal.

Se realizó un análisis estadístico de la diferencia en el volumen tumoral entre los grupos sobre los datos obtenidos en el mejor momento terapéutico después de la dosis final.

Se realizó un ANOVA de una vía para comparar el volumen tumoral entre grupos y cuando se obtuvo un estadístico F significativo (una proporción entre la varianza del tratamiento y la varianza del error), las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba de Games-Howell. Todos los datos se analizaron usando GraphPad Prism 5.0. $P < 0,05$ se consideró ser estadísticamente significativo.

Ejemplo 1: Prueba de eficacia *in vivo* de BCY8245 en el tratamiento del xenoinjerto NCI-H292 (modelo de cáncer de pulmón no microcítico (CPCNP)) en ratones desnudos BALB/c

1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación fue evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de BCY8245 en el tratamiento del modelo de xenoinjerto NCI-H292 en ratones desnudos BALB/c.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (μl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	3	—	10	<i>iv</i>	biw
2	BCY8245	3	1/3/5	10	<i>iv</i>	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	<i>iv</i>	qw
4	BCY8245	3	3 mg/kg	10	<i>iv</i>	biw
5	BCY8245	3	5 mg/kg	10	<i>iv</i>	qw
Nota: n: número de animales; Volumen de posología: ajustar el volumen de posología en función del peso corporal a 10 μl/g.						

3. Materiales

3.1 Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

Especie: *Mus musculus*

Cepa: Balb/c desnudo

Edad: 6-8 semanas

Sexo: hembra

Peso corporal: 18-22 g

Número de animales: 18 ratones para BCY8245 más repuesto

Proveedor de animales: Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm × 180 mm × 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

5 Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

10 Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

3.2 Artículos de prueba y control positivo

15 4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1 Cultivo celular

20 Las células tumorales NCI-H292 se mantendrán en medio suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivarán rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogerán y se contarán para la inoculación del tumor.

4.2 Inoculación tumoral

25 A cada ratón se le inocularán por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales NCI-H292 (10×10^6) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. Los animales se aleatorizarán y el tratamiento se iniciará cuando el tamaño tumoral promedio alcance aproximadamente 158-406 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se muestran en la siguiente tabla de diseño experimental.

30 4.3 Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	1	Disolver 1,61 mg de BCY8245 con 1,604 ml de tampón (vehículo)
	0,1	Diluir 90 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 810 µl de tampón (vehículo)
	0,3	Diluir 270 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 630 µl de tampón (vehículo)
	0,5	Diluir 450 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 450 µl de tampón (vehículo)

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	1	Disolver 10,56 mg de BCY8245 en 10,518 ml de tampón Histidina
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

35 4.4 Recogida de muestras

Al final del estudio, el plasma se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la última posología.

5. Resultados

40 5.1 Curvas de crecimiento tumoral

Las curvas de crecimiento del tumor se muestran en las Figuras 1 y 2.

45 5.2 Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H292 se muestra en las Tablas a continuación:

5

Tabla 4: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Tratamiento	0	2	4	7	9	11	14	16
Vehículo, qw	410±77	516±69	627±61	931±141	1118±225	1208±257	1495±365	1743±419
BCY8245, 1/3/5 mpk, qw	404±65	391±42	542±14	721±136	762±115	607±95	614±89	626±93

Tratamiento	18	21	23	25	28	30	32	35
Vehículo, qw	1950±551	2149±639						
BCY8245, 1/3/5 mpk, qw	611±93	654±152	732±139	755±132	713±114	762±165	968±290	1119±216

Tabla 5: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
	0	2	4	7	9	11	14
Vehículo, qw	161±2	270±14	357±14	448±17	570±16	720±36	948±61
BCY8245, 3 mpk, qw	160±5	220±11	266±15	218±23	167±10	161±36	149±43
BCY8245, 3 mpk, biw	162±13	243±19	211±12	101±11	100±8	87±7	65±3
BCY8245, 5 mpk, qw	160±9	176±7	191±3	105±8	82±3	91±14	83±8

5.3 Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

10

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral para BCY8245 en el modelo de xenoinjerto NCI-H292 en el día 14 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral.

Tabla 6: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
Vehículo, qw	2149±639	--	--	--
BCY8245, 1/3/5 mpk, qw	654±152	30,4	85,7	<i>p</i> <0,05

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

15

Tabla 7: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
Vehículo, qw	948±61	--	--	--
BCY8245, 3 mpk, qw	149±43	15,8	101,4	<i>p</i> <0,001
BCY8245, 3 mpk, biw	65±3	6,9	112,2	<i>p</i> <0,001
BCY8245, 5 mpk, qw	83±8	8,8	109,8	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de BCY8245 se evaluó en el modelo de xenoinjerto NCI-H292. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en las Figuras 1 y 2

y en las Tablas 4 a 7.

El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 879 mm³ el día 14.

- 5 BCY8245 a 1 mg/kg no produjo actividad antitumoral significativa, el artículo de prueba mostró una actividad antitumoral evidente después de aumentar la dosis a 3 mg/kg a partir del día 7, pero la eficacia no mejoró aún más después de aumentar la dosis a 5 mg/kg el día 21. En este estudio, todos los animales tratados mostraron una pérdida continua de peso corporal durante el control estricto de posología, esto puede deberse a la carga tumoral y a la toxicidad de los artículos de prueba.

- 10 BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=149 mm³, TGI=101,4 %, p<0,001), 3 mg/kg, biw (TV=65 mm³, TGI=112,2 %, p<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=83 mm³, TGI=109,8 %, p<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa.

- 15 **Ejemplo 2: Prueba de eficacia *in vivo* de BCY7825, BCY8245, BCY8253, BCY8254 y BCY8255 en el tratamiento del xenoinjerto HT-1376 (modelo de cáncer de vejiga) en ratones CB17-SCID**

1. Objetivo del estudio

- 20 El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto HT-1376 en ratones CB17-SCID.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	3	—	10	iv	qw
2	BCY8245	3	1/3 ^a mg/kg	10	iv	qw
3	Vehículo	5	—	10	iv	qw
4	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
5	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw
6	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw
1 mg/kg durante la primera semana y 3 mg/kg durante las 2 semanas siguientes						

- 25 **3. Materiales**

3.1 Animales y condiciones de alojamiento

- 30 3.1.1. Animales

Especie:	<i>Mus musculus</i>
Cepa:	CB17-SCID
Edad:	6-8 semanas
Sexo:	hembra
Peso corporal:	18-22 g
Número de animales:	21-41 ratones más repuesto
Proveedor de animales:	Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD

3.1.2. Condiciones de alojamiento

- 35 Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

- 40 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm × 180 mm × 150 mm. El material de lecho es mazorca de

maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1 Cultivo celular

Las células tumorales HT-1376 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo en monocapa en medio EMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron de forma rutinaria dos veces por semana mediante tratamiento con tripsina-EDTA. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

4.2 Inoculación tumoral

A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales HT-1376 (5×10^6) en 0,2 ml de PBS con matrigel (1:1) para el desarrollo del tumor. Los animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 153-164 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3 Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	0,1	Diluir 90 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 810 µl de tampón (vehículo)
BCY8245	0,3	Diluir 270 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 630 µl de tampón (vehículo)
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4 Recogida de muestras

Al final del estudio, el plasma del grupo 2 se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la última posología. El plasma del grupo 6 se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la última posología. El tumor del grupo 6 se recogió 2 horas después de la última dosificación. Los tumores de los grupos 4 y 5 se recogieron 2 h después de la última dosificación.

5. Resultados

5.1 Curvas de crecimiento tumoral

Las curvas de crecimiento del tumor se muestran en las Figuras 3 y 4.

5.2 Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones CB17-SCID hembra portadores del xenoinjerto HT-1376 se muestra en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Vehículo, qw	168±37	220±47	274±56	391±73	442±75	503±82	576±84	649±81	801±84	884±81
2	BCY8245, 1/3 mpk, qw	164±16	184±12	206±14	265±21	291±10	281±28	335±16	354±11	309±19	347±14

Tabla 9: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	5	7	9	12	14
3	Vehículo, qw	153±16	266±30	398±41	529±56	721±76	908±91	1069±90
4	BCY8245, 3 mpk, qw	153±26	254±53	298±69	398±61	468±73	502±67	603±76
5	BCY8245, 3 mpk, biw	154±30	248±58	203±15	273±45	356±50	391±53	407±53
6	BCY8245, 5 mpk, qw	153±15	237±41	228±36	317±31	394±20	438±31	465±33

5.3 Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto HT-1376 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 21 después del inicio del tratamiento.

Tabla 10: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
1	Vehículo, qw	884±81	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	347±14	39,2	74,5	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

Tabla 11: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
3	Vehículo, qw	1069±90	--	--	--
4	BCY8245, 3 mpk, qw	603±76	56,4	50,9	<i>p</i> <0,01
5	BCY8245, 3 mpk, biw	407±53	38,1	72,3	<i>p</i> <0,001
6	BCY8245, 5 mpk, qw	465±33	43,5	66,0	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

Grupos 1 y 2

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto HT-1376. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 3 y en las Tablas 8 y 10.

El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 884 mm³ el día 21. BCY8245 a 1 mg/kg produjo una ligera actividad antitumoral y se encontró una mejor eficacia después de aumentar la dosis a 3 mg/kg a partir del día 7.

En este estudio, algunos ratones tratados con el artículo de prueba a 3 mg/kg mostraron una pérdida de peso corporal

sobre el 10 %.

Grupos 3-6

- 5 En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto HT-1376. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 4 y en las Tablas 9 y 11.

- 10 BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=603 mm³, TGI=50,9 %, p<0,01), 3 mg/kg, biw (TV=407 mm³, TGI=72,3 %, p<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=465 mm³, TGI=66,0 %, p<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa.

En este estudio, BCY8245 a 5 mg/kg qw provocó una pérdida de peso corporal sobre el 10 % en los animales durante el programa de tratamiento.

- 15 **Ejemplo 3: Estudio de eficacia *in vivo* de BCY8245 en el tratamiento del xenoinjerto Panc2.13 (modelo de cáncer pancreático) en ratones desnudos Balb/c**

1. Objetivo del estudio

- 20 El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto Panc2.13 en ratones Balb/c desnudos.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	—	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw

25

3. Materiales

3.1 Animales y condiciones de alojamiento

- 30 3.1.1 Animales

Especie: *Mus musculus*

Cepa: Balb/c desnudo

Edad: 6-8 semanas

- 35 Sexo: hembra

Peso corporal: 18-22 g

Número de animales: 41 ratones más repuesto

Proveedor de animales: Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

- 40 3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- 45 • Temperatura: 20-26 °C.
• Humedad 40-70 %.

Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm × 180 mm × 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

50

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

55

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio

del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

5 4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1 Cultivo celular

10 Las células tumorales Panc2.13 se mantendrán en medio RPMI1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 15 % y 10 unidades/ml de insulina recombinante humana a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivarán rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogerán y se contarán para la inoculación del tumor.

4.2 Inoculación tumoral

15 A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales Panc2.13 (5×10^6) con Matrigel (1:1) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 149 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

20 4.3 Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4 Recogida de muestras

25 Al final del estudio, los tumores de todos los grupos se recogieron 2 h después de la última posología.

5. Resultados

30 5.1 Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 5.

35 5.2 Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto Panc2.13 se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Vehículo, qw	149±12	202±12	240±9	321±17	410±27	479±32	545±17
2	BCY8245, 3 mpk, qw	149±34	160±33	191±39	215±53	242±62	259±59	271±54
3	BCY8245, 3 mpk, biw	148±46	170±38	204±57	216±56	236±59	241±60	231±57
4	BCY8245, 5 mpk, qw	149±18	180±11	231±33	242±34	248±40	231±37	238±40

40 5.3 Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto Panc2.13 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 13: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
1	Vehículo, qw	545±17	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	271±54	49,6	69,2	<i>p</i> <0,01
3	BCY8245, 3 mpk, biw	231±57	42,3	79,1	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	238±40	43,6	77,5	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

- 5 En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto Panc2.13. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 5 y en las Tablas 12 y 13.

- 10 BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=271 mm³, TGI=69,2 %, *p*<0,01), 3 mg/kg, biw (TV=231 mm³, TGI=79,1 %, *p*<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=238 mm³, TGI=77,5 %, *p*<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa.

Ejemplo 4: Estudio de eficacia *in vivo* de BCY8245 en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 (modelo de cáncer de mama) en ratones desnudos Balb/c

15 1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de BCY8245 en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 en ratones Balb/c desnudos.

20 2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (μl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw

3. Materiales

25 3.1 Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1 Animales

- 30 Especie: *Mus musculus*
 Cepa: Balb/c desnudo
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 Número de animales: 41 ratones más repuesto
 35 Proveedor de animales: Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

3.1.2. Condiciones de alojamiento

- 40 Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

- 45 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm × 180 mm × 150 mm. El material de lecho es mazorca de

maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1 Cultivo celular

Las células tumorales se mantuvieron en medio L-15 de Leibovitz suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

4.2 Inoculación tumoral

A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales MDA-MB-468 (10×10^6) en 0,2 ml de PBS suplementado con matrigel al 50 % para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 196 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3 Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	1	Disolver 10,56 mg de BCY8245 en 10,518 ml de tampón Histidina
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4 Recogida de muestras

En el día 21 de estudio, el plasma del grupo 2 se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la última posología. Los tumores de los grupos 1 y 3 se recogieron 2 h después de la última dosificación. Los animales del grupo 4 se mantuvieron corriendo durante otros 21 días sin ninguna dosis y los tumores de estos grupos se recolectaron el día 42.

5. Resultados

5.1 Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 6.

5.2 Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468 se muestra en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 0 al día 21)

Gr	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Vehículo, qw	199 ±6	217±9	235±1 5	274±1 4	291±1 4	314±2 0	348±2 4	374±3 3	398±3 9	447±3 9

(continuación)

Gr	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
2	BCY8245, 3 mpk, qw	194 ±12	192±2 6	184±2 0	131±2 0	113±1 7	104±1 3	94±25	81±23	87±23	85±31
3	BCY8245, 3 mpk, biw	195 ±33	193±2 7	154±2 0	103±2 0	83±16	67±14	49±11	45±14	32±12	22±4
4	BCY8245, 5 mpk, qw	199 ±28	193±1 1	135±4	98±5	58±5	49±5	47±2	37±4	35±3	29±3

Tabla 15: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 23 al día 42)

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		23	25	28	32	35	39	42
4	BCY8245, 5 mpk, qw	35±5	48±5	37±7	28±6	24±4	28±6	26±6

5.3 Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 21 después del inicio del tratamiento.

10 Tabla 16: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> con
1	Vehículo, qw	447±39	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	85±31	18,9	144,2	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245, 3 mpk, biw	22±4	4,9	169,8	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	29±3	6,6	168,4	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 6 y en las Tablas 14 a 16.

BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=85 mm³, TGI=144,2 %, *p*<0,001), 3 mg/kg, biw (TV=22 mm³, TGI=169,8 %, *p*<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=29 mm³, TGI=168,4 %, *p*<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa de manera dependiente de la dosis o de la frecuencia de la dosis.

La posología de los grupos de 5 mg/kg se suspendió a partir del día 21, los tumores no mostraron ninguna recaída durante el programa de seguimiento adicional de 3 semanas.

Ejemplo 5: Prueba de eficacia *in vivo* de BCY8549 en el tratamiento del xenoinjerto NCI-H292 (modelo de cáncer de pulmón no microcítico (CPCNP)) en ratones desnudos BALB/c

1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de BCY8549 en el tratamiento del xenoinjerto NCI-H292 en ratones Balb/c desnudos.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	4	—	10	iv	qw
2	BCY8549	3	3	10	iv	qw

3. Materiales

5 3.1 Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

- 10 Especie: *Mus musculus*
 Cepa: Balb/c desnudo
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 Número de animales: 43 ratones más repuesto
 15 Proveedor de animales: Shanghai Lingchang Biotechnology Experimental Animal Co. Ltd

3.1.2. Condiciones de alojamiento

- 20 Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 4 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

- 25 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm × 180 mm × 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

- 30 Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

- 35 Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

40 4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1 Cultivo celular

- 45 Las células tumorales NCI-H292 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo en monocapa en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron de forma rutinaria dos veces por semana mediante tratamiento con tripsina-EDTA. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

50 4.2 Inoculación tumoral

- 55 A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales NCI-H292 (10×10^6) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 43 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 168 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

Preparación de la formulación del artículo de prueba

Tratamiento	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	—	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8549	1	Se disolvieron 2 mg de BCY8549 con 1914 µl de tampón de vehículo
BCY8549	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8549 1 mg/ml con 560 µl de tampón vehículo

4.4 Recogida de muestras

- 5 Al final del estudio, el plasma de los ratones del grupo 2 se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 1 h y 2 h después de la última posología.

5. Resultados

10 5.1 Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 7.

15 5.2 Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H292 se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Vehículo, qw	168±16	297±48	362±58	460±62	548±69	697±102	843±152
2	BCY8549, 3 mpk, qw	168±30	187±36	164±31	205±50	234±57	240±98	251±66
3	BCY8550, 3 mpk, qw	167±18	208±21	237±16	324±35	421±35	489±44	545±77
4	BCY8783, 3 mpk, qw	167±28	182±27	161±40	137±19	135±22	97±20	97±19
5	BCY8784, 3 mpk, qw	167±36	165±28	111±19	121±12	123±8	99±10	94±7

20 5.3 Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto NCI-H292 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 18: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i>
1	Vehículo, qw	843±152	--	--	--
2	BCY8549, 3 mpk, qw	251±66	29,8	87,7	<i>p</i> <0,05

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

- 30 En este estudio, la eficacia terapéutica de los BCY se evaluó en el modelo de xenoinjerto NCI-H292. El volumen tumoral medido de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 7 y en las Tablas 17 y 18.

- 35 El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 843 mm³ el día 14. BCY8549 a 3 mg/kg mostró una actividad antitumoral significativa. En este estudio, todos los ratones mantuvieron bien su peso corporal.

Ejemplo 6: Investigación de la asociación entre la variación del número de copias (CNV) y la expresión génica de Nectina-4 de múltiples tipos de tumores

Métodos

1. Seleccionar todos los estudios en cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) y buscar NECTIN4.

- 5 (a) Eliminar los estudios provisionales.
 (b) Deseleccionar estudios con muestras superpuestas para evitar sesgo de muestra (según la advertencia en cBioPortal); siempre conservar el estudio PanCancer si esta es una opción.
 (c) Estudios seleccionados para el análisis (Tabla 19).

10

Tabla 19: Estudios analizados desde cBioPortal y unidades en estudio

Nombre del estudio	Unidades
Cáncer de mama (METABRIC, Nature 2012 y Nat Commun 2016)	Expresión de ARNm (micromatriz)
Carcinoma invasivo de mama (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Carcinoma endometrial del cuerpo uterino (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Carcinoma urotelial de vejiga (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Adenocarcinoma de pulmón (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Carcinoma de células escamosas del cuello uterino (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Carcinoma de células escamosas de pulmón (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Adenocarcinoma pancreático (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Carcinoma de tiroides (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Adenocarcinoma de colon (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Timoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Sarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Adenocarcinoma de estómago (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Adenocarcinoma de próstata (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Cromóforo renal (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Adenocarcinoma de recto (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Cáncer de próstata metastásico, SU2C/PCF Dream Team (Robinson <i>et al.</i> , Cell 2015)	Expresión / captura de ARNm (RNA Seq RPKM)
Feocromocitoma y paraganglioma (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Carcinoma renal de células claras (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Adenocarcinoma de próstata (CRC Fred Hutchinson, Nat Med 2016)	Expresión de ARNm
Adenocarcinoma colorrectal (TCGA, Nature 2012)	RNA Seq RPKM
Cistoadenocarcinoma seroso de ovario (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Carcinoma de células papilares renales (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Glioma cerebral de grado inferior (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Adenocarcinoma esofágico (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)

(continuación)

Nombre del estudio	Unidades
Carcinoma de la corteza suprarrenal (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Glioblastoma multiforme (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Adenocarcinoma de próstata (MSKCC, Cancer Cell 2010)	Expresión de ARNm
Carcinosarcoma uterino (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Leucemia mieloide aguda (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Melanoma cutáneo de piel (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Mesotelioma (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Colangiocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Leucemia linfocítica aguda pediátrica: fase II (TARGET, 2018)	NECTINA4: Expresión de ARNm (RNA-Seq RPKM)
Linfoma difuso de células B grandes (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Enciclopedia de líneas celulares de cáncer (Novartis/Broad, Nature 2012)	Expresión de ARNm (micromatriz)
Melanoma uveal (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Tumor de Wilms pediátrico (TARGET, 2018)	NECTINA4: Expresión de ARNm (RNA-Seq RPKM)
Tumores de células germinales testiculares (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/fusionado de Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Carcinoma hepatocelular de hígado (TCGA, PanCancer Atlas)	NECTINA4: Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq_RNASeqV2)

2. Exportar datos de expresión de CNV y ARN desde cBioPortal.

3. Probar si los CNV están asociados de manera estadísticamente significativa con los cambios en la expresión del ARNm para Nectina-4 (log2 no aplicado).

(a) Ejecutar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en GraphPad Prism (7.04) y R/R Studio (umbral de significancia: $p < 0,01$).

- (i) GraphPad Prism: configurar tabla de columnas, ejecutar prueba no paramétrica sin coincidencia ni correspondencia y no asumir una distribución gaussiana.
- (ii) Paquetes usados en R:

1. XLConnect

2. dplyr

3. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis: Prueba Kruskal.

4. Ajustar para comparaciones múltiples (incluir todas las comparaciones posibles incluso si $n = 1$ dentro de un grupo) en R/Rstudio usando la prueba de Dunn (umbral de significancia: $p < 0,025$).

(a) prueba de dunn con método de comparación múltiple = "bonferroni".

Resultados

- Los resultados se muestran en la Tabla 20 a continuación. En 41 conjuntos de datos TCGA disponibles públicamente que informan datos de expresión génica de ARNm y CNV tumoral para Nectina-4, hay muchos indicios en los que se han notificado casos con ganancias en el número de copias de Nectina-4 (2-3 copias) o amplificaciones (>3 copias). Además, se ha demostrado que algunos casos aislados tienen eliminaciones superficiales (<2 copias) con informes raros de tumores que contienen deleciones profundas consistentes con una pérdida de más de 1 copia o una pérdida bialélica de Nectina-4. Las indicaciones donde se detectaron amplificaciones con mayor frecuencia fueron cáncer de mama (10-22 %), cáncer de vejiga (20 %), cáncer de pulmón (5-7 %) y carcinoma hepatocelular (8 %). Las indicaciones con pérdidas de número de copias más frecuentes fueron cromóforo de riñón (77 %), carcinoma renal de células claras (CCR) (6,5 %), sarcoma (10 %), cáncer de colon (10 %), cáncer de cabeza y cuello (7 %) y cáncer escamoso de pulmón. Estos datos indican que existe una variedad de CNV dentro y entre las indicaciones tumorales

y una diversidad de patrones de número de copias en diferentes indicaciones.

Además de las CNV dentro del conjunto de datos TCGA, el nivel medio de expresión del ARNm de Nectina-4 por indicación cubre aproximadamente el intervalo de 2^{10} . Por lo tanto, dado el intervalo de niveles de expresión de ARNm de Nectina-4 y las CNV observadas entre y dentro de los tipos de tumores, se realizaron pruebas estadísticas para identificar posibles asociaciones entre los niveles de ARNm de Nectina-4 y las CNV de Nectina-4 dentro de los conjuntos de datos/indicaciones individuales de TCGA. Los tumores por indicación se asignaron a 1 de 5 clases:

- 5
- 10
 - a) Eliminación profunda;
 - b) Eliminación superficial;
 - c) Diploide;
 - d) Ganancia; o
 - e) Amplificación.

- 15 A continuación se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para detectar si las distribuciones de los valores de expresión de ARNm por clases diferían entre clases ($P < 0,01$). Para aquellos conjuntos de datos TCGA con $P < 0,01$ y para identificar qué clases eran diferentes entre sí se realizó prueba *post hoc* calculando estadísticas Z con valores P ajustados calculados (Bonferroni). Para simplificar la interpretación se revisaron las comparaciones por pares frente a diploide por indicación (aunque se calcularon todos los valores de P por pares). 18/41 estudios de TCGA cumplieron con los criterios de Kruskal-Wallis $P < 0,01$ y Bonferroni $P < 0,025$ para las comparaciones de ganancia frente a diploide y/o amplificación frente a diploide, lo que indica una asociación entre una mayor expresión del ARNm de Nectina-4 y un mayor número de copias de Nectina-4. Estos 18 estudios representaron 14 histologías tumorales independientes:
- 20 mama, útero, vejiga, adenocarcinoma de pulmón, escamoso pulmonar, cervicouterino, cabeza y cuello, pancreático, tiroides, colorrectal, timoma, sarcoma, carcinoma de células claras (CCR) renal y de estómago.
- 25

Además, 6 estudios han disminuido la expresión de ARNm asociada a la pérdida del número de copias. Cuatro de estos seis estudios no solo mostraron una asociación entre la pérdida de CNV y la expresión reducida, pero también informaron ganancias de CNV asociadas con alta expresión:

- 30 estómago, escamoso pulmonar, colon y tiroides.

Considerando dos indicaciones, cromóforo renal y el cáncer de próstata solo informaron asociaciones con pérdida de CNV y baja abundancia de transcripción. Adicionalmente, hubo un estudio separado sobre cáncer de próstata (Metastatic Prostate Cancer, SU2C/PCF Dream Team (Robinson *et al.*, Cell 2015)) que mostró ganancias en el número de copias asociadas con una alta expresión (en relación con el diploide).

- 40 Estas observaciones de pérdida y ganancia de CNV tumoral con los niveles de expresión de ARNm pueden representar el mecanismo detrás de la expresión de la proteína tumoral Nectina-4 en aquellas indicaciones donde se observaron tales asociaciones. Es evidente que existen indicios de que las CNV no parecen afectar los niveles de expresión del ARNm siguiendo un patrón predecible tal como en el carcinoma hepatocelular. Se ha demostrado que la eficacia preclínica *in vivo* con ciertos conjugados de fármacos bicíclicos Nectina-4 de la invención se correlaciona con la expresión de la proteína Nectina-4 medida mediante IHC. Por lo tanto, si las CNV de Nectina-4 tumorales se asocian a los niveles de ARNm y predicen los niveles de expresión de proteínas, es formalmente posible que los pacientes con tumores que contienen aumentos en el número de copias (ganancia o amplificación) tengan más probabilidades de responder a los conjugados de fármacos bicíclicos de Nectina-4 de la invención. Si pudieran identificarse pacientes con CNV aumentadas en Nectina-4 entonces esta información podría usarse para seleccionar pacientes para el tratamiento con conjugados de fármacos bicíclicos Nectina-4 de la invención.
- 45

Tabla 20: Resultados de la investigación sobre la asociación entre la variación del número de copias (CNV) y la expresión génica de la Nectina-4

Nombre del estudio	Unidades	Número de muestras/grupo (n-x)					Prueba de Kruskal-Wallis		Comparación por pares, Estadística Z (valor de p ajustado)			
		Eliminación profunda	Eliminación superficial	Diploide	Ganancia	Amplificación	Estadística de Kruskal-Wallis	valor de p	Eliminación profunda: Diploide	Diploide: Eliminación superficial	Diploide: Ganancia	Amplificación: Diploide
Cáncer de mama (METABRIC, Nature 2012 y NCI Cancer 2018)	Expresión de ARN de Nectina-4 (normalizado)	0	11	245	706	464	380.4	< 2.2E-16	N/D	0.58782 (1.9003)	-1.185096 (0.0000)*	-18.85085 (0.0000)*
Cáncer de mama invasivo de mama (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARN de Nectina-4 normalizado (combinado de Illumina HiSeq, RNASeq V2, SYN4376363)	0	15	244	840	97	319.5	< 2.2E-16	N/D	1.186089 (0.1065)	-1.133176 (0.0000)*	12.97432 (0.0000)*
Cáncer de mama endocrinal del cuerno uterino (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARN de Nectina-4 normalizado (combinado de Illumina HiSeq, RNASeq V2, SYN4376363)	0	8	274	210	18	76.392	< 2.2E-16	N/D	1.130804 (0.7743)	-7.274308 (0.0000)*	5.601260 (0.0000)*
Cáncer de mama uterino de vejiga (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2	0	16	171	145	70	67.376	1.80E-13	N/D	0.660307 (1.0000)	-3.323629 (0.0027)*	8.054289 (0.0000)*
Adenocarcinoma de pulmón (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARN de Nectina-4 normalizado (combinado de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	0	9	129	332	33	63.576	7.34E-13	N/D	0.237230 (1.0000)	-5.244156 (0.0000)*	6.247228 (0.0000)*
Cáncer de células escamosas del cuello uterino (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM normalizado por lotes a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2	0	7	115	147	8	81.172	4.08E-11	N/D	1.093743 (0.8223)	-8.170367 (0.0000)*	3.815296 (0.0000)*
Cáncer de células escamosas de pulmón (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARN de Nectina-4 normalizado (combinado de Illumina HiSeq, RNASeq V2, SYN4376363)	0	23	139	272	23	42.136	3.77E-09	N/D	2.019759 (0.0144)*	-3.294709 (0.0072)*	4.860629 (0.0000)*
Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARN de Nectina-4 normalizado (combinado de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	0	32	330	122	4	37.81	3.10E-08	N/D	1.738867 (0.2473)	-4.840850 (0.0000)*	3.033083 (0.0073)*
PanCancer Atlas												
Adenocarcinoma pancreático (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARN de Nectina-4 normalizado (combinado de Illumina HiSeq, RNASeq V2, SYN4376363)	0	7	105	50	6	36.853	4.92E-08	N/D	1.233133 (0.5474)	-4.388701 (0.0000)*	4.166401 (0.0001)*

(continuación)

Nombre del estudio	Unidades	Número de muestras/grupos (n/A)					Pruebas de Kruskal-Wallis		Correlaciones por pares, estadística Z, p-valor de p-ajustado			
		Eliminación profunda	Eliminación superficial	Díptide	Ganancia	Amplificación	Estadística de Kruskal-Wallis	valor de p	Eliminación profunda: Díptide	Díptide: Eliminación superficial	Díptide: Ganancia	Amplificación: Díptide
Carcinoma de broncos (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/suma de ARNm: H3Seq, RNASeq V2, SYN2576339	11	3	423	26	0	37.382	1.16E-07	N/D	-2.438724 (0.0133)*	-5.02723 (0.0000)*	N/D
Adenocarcinoma de colon (TCGA, PanCancer Atlas)	RSE M (normalizado por lotes a partir de H3Seq, RNASeq V2)	0	41	286	10	3	31.301	7.32E-07	N/D	3.111121 (0.0004)*	-2.38723 (0.0000)*	1.785608
PanCancer Atlas	H3Seq, RNASeq V2										(0.0004)*	(0.235)
Tirónia (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/suma de ARNm: H3Seq, RNASeq V2, SYN2576339	0	0	96	22	2	28.213	2.10E-08	N/D	N/D	-4.602115 (0.0000)*	1.597541 (0.175)
Sarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/suma de ARNm: H3Seq, RNASeq V2, SYN2576339	0	22	120	74	14	28.831	8.29E-08	N/D	-0.411639 (1.0000)	-2.582147 (0.0000)*	3.708262 (0.0007)*
Adenocarcinoma de estómago (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/suma de ARNm: H3Seq, RNASeq V2, SYN2576339	0	11	263	134	9	19.086	0.10E-04	N/D	2.835668 (0.0137)	-2.527583 (0.0104)*	-0.285333 (1.000)
Adenocarcinoma de páncreas (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM normalizado por lotes a partir de H3Seq, RNASeq V2	3	15	427	29	3	19.125	0.0007426	-2.530734 (0.0008)	3.202764 (0.0008)*	-1.351661 (0.0024)	0.009151 (1.0000)
Carcinoma renal (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM normalizado por lotes a partir de H3Seq, RNASeq V2	0	59	14	1	9	13.867	0.0008513	N/D	3.809725 (0.0000)*	-0.168395 (1.0000)	N/D
Adenocarcinoma de recto (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm	0	11	91	32	1	14.266	0.00293	N/D	1.050763 (0.0001)	-2.255783 (0.0000)*	1.285506 (0.211)
PanCancer Atlas	Normalizado/suma de ARNm: H3Seq, RNASeq V2, SYN2576339										(0.0000)*	(0.211)
Cáncer de páncreas (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM normalizado por lotes a partir de H3Seq, RNASeq V2	0	3	76	17	2	12.336	0.200317	N/D	0.140168 (1.0000)	-3.450478 (0.0019)*	-1.265119 (1.0000)
Cáncer de páncreas (TCGA, PanCancer Atlas)	Lote de expresión de ARNm normalizado/suma de ARNm: H3Seq, RNASeq V2, SYN2576339	0	14	123	19	5	11.973	0.000868	N/D	-1.271328 (0.0108)	-2.597781 (0.0021)*	2.297973 (0.0000)

(continuación)

Nombre del estudio	Unidades	Número de muestras/grupos (n=x)					Prueba de Kruskal-Wallis			Comparación por pares, Estadística Z (valor de p ajustado), Bonferroni		
		Eliminación profunda	Eliminación superficial	Diploide	Ganancia	Amplificación	Estadística de Kruskal-Wallis	valor de p	Eliminación profunda, Diploide	Diploide: Eliminación superficial	Diploide: Ganancia	Amplificación: Diploide
Atlas	Radio de Illumina HiSeq, RNASeq V2											
Carcinoma renal de células claras (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lores a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	0	32	297	32	1	11.314	0.01014	N/D	-0.146386 (1.0000)	-2.836952 (0.00527)	1.502464 (0.3500)
Adenocarcinoma de colon recto (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm	0	1	58	68	7	9.9842	0.01858	N/D	0.677737 (1.0000)	-0.409530 (1.0000)	3.028793 (0.0074)
Adenocarcinoma de estómago (TCGA, PanCancer Atlas)	RNA Seq RPKM	0	4	153	34	2	9.8054	0.02	N/D	0.053994 (1.0000)	-1.893676 (0.1694)	2.814853 (0.0157)
Cáncer de mama de tipo ductal (TCGA, PanCancer Atlas)	Radio de expresión de ARNm normalización	0	7	75	117	2	9.3121	0.02544	N/D	1.585035 (0.3682)	-2.156235 (0.062706)	
PanCancer Atlas	Radio de expresión de ARNm a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2											
Carcinoma de células renales papilares (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lores a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	1	19	238	15	0	9.1134	0.02782	1.867184 (0.2337)	-0.589938 (1.0000)	-1.552085 (0.1521)	N/D
Gloma cortical de grado II/III (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lores a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	0	11	402	32	2	4.769	0.1995	N/D	0.482462 (1.0000)	-1.719935 (0.2569)	1.251965 (0.6209)
Adenocarcinoma endometrial (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lores a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	0	8	78	86	8	4.207	0.234	N/D	0.747141 (1.0000)	-0.758865 (1.0000)	1.758911 (0.2388)
Carcinoma de la cabeza supratentorial (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (normalizado por lores a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	0	9	54	11	2	4.0286	0.2563	N/D	0.157281 (1.0000)	-0.131234 (1.0000)	1.914893 (0.1415)
Glioblastoma multiforme (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm, RSEM (normalizado por lores a partir de Illumina HiSeq, RNASeq V2)	0	3	115	27	0	2.0252	0.2681	N/D	0.180184 (1.0000)	-1.532735 (0.1665)	N/D
Adenocarcinoma de estómago (TCGA, PanCancer Atlas)	Expresión de ARNm	0	3	78	4	0	2.181	0.3561	N/D	1.423206 (0.2329)	0.454433 (0.9743)	N/D

(continuar en)

Nombre del estudio	Unidades	Número de muestras/grupo (n/k)					Estatística de Kruskal-Wallis					Comparación por pares: Estadística Z (valor de p ajustado)				
		Eliminación profunda	Eliminación superficial	Diploide	Gainancia	Amplificación	Estadística de Kruskal-Wallis	valor de p	Eliminación profunda: Diploide	Diploide: Eliminación superficial	Diploide: Gainancia	Amplificación: Diploide	Eliminación profunda: Diploide	Diploide: Eliminación superficial	Diploide: Gainancia	Amplificación: Diploide
Carcinoma de células renales (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	4	14	37	1	2,395	0,3463	N/D	0,103285 (1,0000)	-0,592165 (1,0000)	1,764233 (0,1389)	N/D	0,103285 (1,0000)	-0,592165 (1,0000)	1,764233 (0,1389)
Leucemia mieloide aguda (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	0	163	2	1	0,85038	0,3833	N/D	N/D	0,909052 (0,1817)	N/D	N/D	N/D	0,909052 (0,1817)	N/D
Adenocarcinoma de pulmón (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	1	18	148	188	8	3,8483	0,4557	-0,888157 (1,0000)	-0,116884 (1,0000)	-0,128317 (1,0000)	0,220287 (0,3000)	-0,888157 (1,0000)	-0,116884 (1,0000)	-0,128317 (1,0000)	0,220287 (0,3000)
Melanoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	2	48	23	1	2,1147	0,4384	N/D	-0,416446 (0,4812)	0,418208 (1,0000)	0,143440 (1,0000)	N/D	-0,416446 (0,4812)	0,418208 (1,0000)	0,143440 (1,0000)
Coloidecarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	0	13	18	5	1,3968	0,5205	N/D	N/D	-0,553161 (0,7769)	1,121035 (0,3594)	N/D	N/D	-0,553161 (0,7769)	1,121035 (0,3594)
Leucemia linfocítica aguda (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	4	66	10	1	2,2397	0,5859	N/D	0,131089 (1,0000)	-0,593875 (1,0000)	-0,137528 (0,5067)	N/D	0,131089 (1,0000)	-0,593875 (1,0000)	-0,137528 (0,5067)
Linfoma difuso de células B grandes (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	2	25	8	1	1,4938	0,6837	N/D	0,374642 (1,0000)	1,173506 (0,7289)	-0,415644 (1,0000)	N/D	0,374642 (1,0000)	1,173506 (0,7289)	-0,415644 (1,0000)
Endometrio de células cancerosas (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	1	112	388	319	49	1,9913	0,7508	-0,598304 (1,0000)	0,582427 (1,0000)	0,847920 (1,0000)	0,379281 (1,0000)	-0,598304 (1,0000)	0,582427 (1,0000)	0,847920 (1,0000)	0,379281 (1,0000)
Melanoma uveal (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	3	72	6	0	0,657014	0,7384	N/D	N/D	-0,268603 (0,3872)	N/D	N/D	N/D	-0,268603 (0,3872)	N/D
Tumor de Wilms (TCGA, PanCancer Atlas)	Letra de expresión de ARNm normalizada (con 3 ppm) y B2M	0	1	55	46	8	0,78538	0,8203	N/D	0,165621 (1,0000)	-0,816815 (1,0000)	-0,198071 (0,1009)	N/D	0,165621 (1,0000)	-0,816815 (1,0000)	-0,198071 (0,1009)

(continuación)

Nombre del estudio	Unidades	Número de muestras/grupo (n=)					Prueba de Kruskal-Wallis		Comparación por pares: Estadística Z (valor de p ajustado)			
		Eliminación profunda	Eliminación superficial	Diploide	Ganancia	Amplificación	Estadística de Kruskal-Wallis	valor de p	Eliminación profunda: Diploide	Diploide: Eliminación superficial	Diploide: Ganancia	Amplificación: Diploide
Tumores vestibulares de células germinales	Nota de expresión de Affym	0	1	78	67	0	0,14278	0,9311	N/A	-0,388869 (1,6000)	0,081216	N/A
TCGA_PanCancer Atlas	Normalizado: expresión de Buzina 46Seq, RNASeq V2 5744773393										11,0000	
Carcinoma hepatocelular de Hígado (TCGA_PanCancer Atlas)	Expresión de Affym, RNASeq normalizada por todos a partir de Buzina 46Seq, RNASeq V2	0	1	86	224	34	0,3938	0,5018	N/A	0,082416 (1,0000)	0,188863 (1,0000)	0,381344 (1,0000)

Ejemplo 7: Análisis de expresión de Nectina-4 en 6 líneas celulares**1. Objetivo del estudio**

- 5 El objetivo del estudio fue evaluar la expresión de Nectina-4 en 6 líneas celulares mediante citometría de flujo, incluyendo 2 líneas celulares de cáncer de mama (T-47D, MDA-MB-468), 3 de cáncer de pulmón (NCI-H292, NCI-H322, NCI-H526) y 1 de fibrosarcoma (HT-1080).

2. Diseño de paneles

10

Panel para FCM en T-47D, MDA-MB-468, NCI-H292, NCI-H322 y HT-1080

Fluorocromo	Blanco	Isotipo	Panel
PE	-	Isotipo ctrl	Nectina-4

Panel para NCI-H526

15

Fluorocromo	Blanco	Isotipo	Panel
PE	-	Isotipo ctrl	Nectina-4
BV421	Vivas/muertas	Vivas/muertas	Vivas/muertas

3. Material**3.1. Muestra**

20

Lista de líneas celulares

Elemento	Líneas celulares	Tipo de cáncer	Proveedor	Propiedades de cultivo	Medio de cultivo
1	T-47D	Cáncer de mama	ATCC-HTB-133	adherente	RPML-1640+0,2 Unidades/ml de insulina bovina+10 % de FBS
2	MDA-MB-468	Cáncer de mama	ATCC-HTB-132	adherente	L-15 de Leibovitz+FBS al 10 %
3	NCI-H292	Pulmón	91091815	adherente	RPML-1640+FBS al 10 %
4	NCI-H322	Pulmón	95111734	adherente	RPML-1640+Glutamina 2 mM+FBS al 10 %
5	NCI-H526	Pulmón	CRL-5811	racimos redondos en suspensión	RPML-1640+FBS al 10 %
6	HT1080	Fibrosarcoma	ECACC-85111505	adherente	EMEM+glutamina 2 mM+1 % de aminoácidos no esenciales (NEAA)+FBS al 10 %

3.2. Reactivos

25

Anticuerpos y kit para análisis de citometría de flujo

Fluorescencia	Marcador	Catálogo	Proveedor	Comentario
PE	Nectina-4	FAB2659P	R&D	AAAO0217021
PE	Control de isotipo IgG2b	IC0041P	R&D	Desde BICY-20161117A
DPBS (Corning-21-031-CV) Tampón de tinción (eBioscience-00-4222) Tampón de fijación (BD-554655)				

3.3. Instrumentos

30

Centrífuga Eppendorf 5810R
Citómetro de flujo BD FACS Canto (BD)

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1. Recogida de muestras

- 5 Recoger las líneas celulares que crecen en una fase de crecimiento exponencial. Contar células mediante hemocitómetro con tinción azul tripán. Centrifugar las células a 400Xg durante 5 min a 4 °C, lavar las células dos veces con tampón de tinción y suspender las células en el tampón de tinción hasta $1 \times 10^7/\text{ml}$.

4.2. Tinción de anticuerpos

- 10 1) Se alicuotaron 100 μl de suspensión celular en cada pocillo de una placa en V de 96 pocillos.
 2) Se añadió control de isotipo o anticuerpos a las células en suspensión y se incubó durante 30 min a 4 °C en la oscuridad.
 3) Se lavaron las células 2X mediante centrifugación a 400 X g durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
 15 4) Se resuspendieron las células con 100 μl de tampón de fijación y se incubaron durante 30 min a 4 °C en la oscuridad.
 5) Se lavaron las células 2 X mediante centrifugación a 300 X g durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante.
 6) Se resuspendieron las células en 400 μl de tampón de tinción.
 7) Se analizaron los datos FACS usando el software FlowJo V10.

4.3. Análisis de datos

Todos los datos FACS se analizaron mediante el software Flowjo V10 y el software Graphpad Prism o Excel.

5. Resultados

5.1 Estrategia de clasificación para el panel

La estrategia de clasificación de Nectina-4 se muestra en las Figuras 8-11.

5.2. Análisis de datos

5.2.1. Viabilidad de líneas celulares

La viabilidad de las líneas celulares fue como a continuación.

N.º	Línea celular	Tipo de cáncer	Viabilidad	Células viables/millón
1	T-47D	Mama	98,1	8,6
2	MDA-MB-468	Mama	98,7	5,3
3	NCI-H292	Pulmón	98,7	10,4
4	NCI-H322	Pulmón	98,5	6,6
5	NCI-H526	Pulmón	79,9	4,0
6	HT1080	Fibrosarcoma	98,0	14,7

5.2.2. La expresión positiva de Nectina-4 en líneas celulares

La expresión positiva y MFI de Nectina-4 en 6 líneas celulares eran como se enumera.

N.º	Línea celular	Nectina-4	Isotipo MFI	Panel de MFI
1	T-47D	99,0 %	132	1808
2	MDA-MB-468	99,0 %	184	2324
3	NCI-H292	97,9 %	180	729
4	NCI-H322	99,1 %	145	1655
5	NCI-H526	0,21 %	104	91,3
6	HT1080	1,53 %	134	134

6. Análisis

Hubo una alta expresión de Nectina-4 en el cáncer de mama T-47D (99,0 %), MDA-MB-468 (99,0 %) y cáncer de pulmón NCI-H292 (97,9 %), NCI-H322 (99,1 %). En NCI-H526 y HT-1080, no se encontró expresión de Nectina-4.

Ejemplo 8: Análisis de expresión de Nectina-4 en 9 líneas celulares CDX mediante citometría de flujo 1. Objetivo del estudio

El objetivo de este proyecto es evaluar la expresión superficial de Nectina-4 (PVRL-4) en 9 líneas celulares, incluyendo 1 línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-468), 4 de cáncer de pulmón (NCI-H292, NCI-H358, NCI-H526, A549), 1 de cáncer pancreático (Panc02.13), 2 de cáncer colorrectal (HCT-116, HT-29) y 1 de cáncer de vejiga (HT1376).

2. Diseño de paneles

Panel para FCM en 9 líneas celulares

Fluorocromo	Blanco	Isotipo	Panel
PE	-	Control de isotipo IgG2b	Nectina-4
BV421	Vivas/muertas	Vivas/muertas	Vivas/muertas

3. Materiales**3.1 Muestras**

Lista de líneas celulares

Elemento	Línea celular	Tipo de cáncer	Proveedor	Propiedades de cultivo	Medio de cultivo
1	HT1376	Vejiga	ATCC-CRL-1472	adherente	EMEM + FBS al 10 %
2	MDA-MB-468	Mama	ATCC-HTB-132	adherente	L-15 de Leibovitz+FBS al 10 %
3	HCT-116	Colorrectal	ATCC-CCL-247	adherente	RPMI 1640 + FBS al 10 %
4	HT-29	Colorrectal	ATCC-HTB-38	adherente	5a de McCoy + FBS al 10 %
5	A549	Pulmón	ATCC-CCL-185	adherente	F-12K + FBS al 10 %
6	NCI-H292	Pulmón	ECACC-91091815	suspensión	RPMI 1640 + FBS al 10 %
7	NCI-H358	Pulmón	ECACC-95111733	adherente	RPMI 1640 + FBS al 10 %
8	NCI-526	Pulmón	ATCC-CRL-5811	adherente	RPMI 1640 + FBS al 10 %
9	Panc02.13	Páncreas	ATCC-CRL-2554	adherente	RPMI-1640+FBS al 15 %+insulina humana 5 ug/ml

3.2. Reactivos

- 1) DPBS (Corning, 21-031-CV)
- 2) Tripsina al 0,25 % (Invitrogen-25200072)
- 3) Tampón de tinción (eBioscience, 00-4222)
- 4) Tampón de fijación (BD, 554655)
- 5) Anticuerpo

Fluorescencia	Marcador	Catálogo	Proveedor	Comentario
PE	Nectina-4	FAB2659P	R&D	AAAO0217021
PE	IgG2b de ratón	IC0041P	R&D	
BV421	Vivas/muertas	L34964	Invitrogen	-

3.3. Instrumentos

Centrífuga Eppendorf 5810R
Citómetro de flujo BD FACS Canto (BD)

4. Métodos y procedimientos experimentales**4.1 Cultivo celular****Descongelación celular**

- 1) Se limpiaron los viales congelados con alcohol al 70 % y se descongelaron rápidamente en un baño María a 37 °C.
- 2) Se centrifugó la suspensión celular a aproximadamente 1000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió medio de precalentamiento a los matraces.
- 3) Se incubaron los matraces de cultivo a 37 °C, incubadora de CO₂ al 5 %.

Paso celular

- 1) Se calentaron el medio y la tripsina en baño María a 37 °C.
- 2) Se retiró el medio de cultivo y se enjuagó la capa de células con DPBS.
- 3) Se añadieron 5 ml de solución de tripsina al 0,25 % al matraz y se diluyó la tripsina con 5 ml de medio.
- 4) Se centrifugó la suspensión celular a 1000 rpm durante 5 min.
- 5) Se añadieron 15 ml de medio fresco y se resuspendieron las células pipeteando suavemente.
- 6) Se añadió la suspensión celular apropiada a nuevos matraces de cultivo.
- 7) Se incubaron los matraces de cultivo a 37 °C, incubadora de CO₂ al 5 %.

4.2. Recogida de muestras

Se recogieron las líneas celulares que crecen en una fase de crecimiento exponencial. Se contaron las células con tinción azul tripán. Se centrifugaron las células a 400×g durante 5 min a 4 °C, se lavaron las células con tampón de tinción dos veces y se suspendieron las células en tampón de tinción a 5×10^6 /ml.

4.3. Tinción de anticuerpos

Se alicuotaron 100 µl de suspensión celular en cada pocillo de una placa V de 96 pocillos. Se añadió control de isotipo o anticuerpos a las células en suspensión y se incubó durante 30 min a 4 °C en la oscuridad. Se lavaron las células 2 veces mediante centrifugación a 400×g durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 300 µl de tampón de tinción. Se analizaron los datos FACS usando el software Flow Jo V10.

4.4. Análisis de datos

Todos los datos FACS se analizaron mediante el software Flow Jo V10 y el software GraphPad Prism o Excel.

5. Resultados**5.1. Estrategia de clasificación para el panel**

La estrategia de clasificación de Nectina-4 se muestra en las Figuras 12-16.

5.2. Análisis de datos

La expresión positiva y MFI de Nectina-4 en 9 líneas celulares eran como se enumera.

N.º	Línea celular	Nectina-4	Isotipo MFI	Panel de MFI
1	HT1376	92,4 %	36,2	803
2	MDA-MB-468	97,1 %	28,9	460
3	HCT-116	1,85 %	14,5	15,6
4	HT-29	40,0 %	20,5	88,3
5	A549	1,07 %	20,5	21,6
6	NCI-H292	71,1 %	22,9	149

(continuación)

N.º	Línea celular	Nectina-4	Isotipo MFI	Panel de MFI
7	NCI-H358	90,1 %	26,5	361
8	NCI-526	1,22 %	8,33	12,1
9	Panc02.13	51,9 %	36,2	128

6. Análisis

- 5 Hubo una alta expresión de Nectina-4 en el cáncer de vejiga HT-1376 (92,4 %), cáncer de mama MDA-MB-468 (97,1 %) y cáncer de pulmón NCI-H358 (90,1 %). Se encontró una expresión media de Nectina-4 en HT-29 (40,0 %), NCI-H292 (71,1 %) y Panc02.13 (51,9 %). En HCT-116, A549 y NCI-526, no se encontró expresión de Nectina-4. Estos datos se usarán para orientar la selección de modelos para estudios de eficacia.

10 Ejemplo 9: Estudios de eficacia *in vivo*

Ejemplo 9.1: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto A549 en ratones Balb/c desnudos

15 1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto A549 en ratones Balb/c desnudos.

20 2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw

3. Materiales

25 Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

- 30 Especie: *Mus musculus*
 Cepa: Balb/c desnudo
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 Número de animales: 41 ratones más repuesto

35 3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20~26 °C.
- Humedad 40-70 %.

45 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

50 Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1. Cultivo celular

Las células tumorales A549 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo en monocapa en medio F-12K suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron de forma rutinaria dos veces por semana mediante tratamiento con tripsina-EDTA. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

4.2. Inoculación del tumor

A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales A549 (5×10^6) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 158 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4. Recogida de muestras

Al final del estudio, los tumores de todos los grupos se recogieron 2 h después de la última posología.

5. Resultados

5.1. Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 17.

5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto A549 se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	5	7	9	12	14
1	Vehículo, qw	158±13	235±24	278±26	346±39	387±35	471±45	568±49
2	BCY8245, 3 mpk, qw	157±10	208±15	197±25	257±40	293±41	341±54	356±53
3	BCY8245, 3 mpk, biw	157±14	183±27	158±16	184±6	182±8	190±15	194±27
4	BCY8245, 5 mpk, qw	157±14	179±22	147±10	172±23	173±24	204±36	228±33

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto A549 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 22: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
1	Vehículo, qw	568±49	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	356±53	62,8	51,4	<i>p</i> <0,05
3	BCY8245, 3 mpk, biw	194±27	34,2	90,8	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	228±33	40,2	82,6	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.
b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto A549. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 17 y en las Tablas 21 y 22.

El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 568 mm³ el día 14. BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=356 mm³, TGI=51,4 %, *p*<0,05), 3 mg/kg, biw (TV=194 mm³, TGI=90,8 %, *p*<0,01) y 5 mg/kg, qw (TV=228 mm³, TGI=82,6 %, *p*<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa de manera dependiente de la dosis o de la frecuencia de la dosis.

Los animales de los grupos BCY8245 mantuvieron bien el peso corporal. En esta línea celular, que muestra una expresión mínima de Nectina-4 en estudios FACS, el crecimiento tumoral está restringido por BCY8245 pero el tumor no experimenta regresión, enfatizando el requisito impulsado por dianas para una eficacia óptima.

Ejemplo 9.2: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto HCT116 en ratones Balb/c desnudos

1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto HCT116 en ratones Balb/c desnudos.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (μl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5	10	iv	qw

3. Materiales

3.1. Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

Especie: *Mus musculus*
Cepa: Balb/c desnudo
Edad: 6-8 semanas
Sexo: hembra
Peso corporal: 18-22 g
Número de animales: 41 ratones más repuesto

3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20~26 °C.
- Humedad 40-70 %.

5 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

10 Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1 Cultivo celular

Las células tumorales HCT116 se mantuvieron en medio suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

4.2. Inoculación del tumor

30 A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales HCT116 ($5,0 \times 10^6$) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 166 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

35 4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4. Recogida de muestras

40 Al final del estudio el día 14, los tumores de los grupos 1 y 2 se recogieron para FFPE. Para el grupo 4, el plasma se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la dosificación. Los tumores también se recogieron y se almacenaron a -80 °C.

5. Resultados

45 5.1. Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 18.

50 5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto HCT116 se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Grupo	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	4	7	9	12	14
1	Vehículo, qw	166±12	219±21	323±29	397±28	488±36	630±49	769±71
2	BCY8245, 3 mpk, qw	167±11	209±13	227±17	269±33	324±39	348±27	425±28
3	BCY8245, 3 mpk, biw	166±18	229±40	215±42	213±49	213±48	206±55	197±50
4	BCY8245, 5 mpk, qw	166±35	201±42	176±15	183±17	170±16	125±18	134±12

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

- 5 La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto HCT116 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 24: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i>
1	Vehículo, qw	769±71	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	425±28	55,2	57,1	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245, 3 mpk, biw	197±50	25,6	94,9	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	134±12	17,4	105,2	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM; b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

10 6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto HCT116. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 18 y en las Tablas 23 y 24.

15 El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 769 mm³ el día 14 después del inicio del tratamiento. BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=425mm³, TGI=57,1 %, *p*<0,001), 3 mg/kg, biw (TV=197 mm³, TGI=94,9 %, *p*<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=134 mm³, TGI=105,2 %, *p*<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa de manera dependiente de la dosis o de la frecuencia de la dosis.

20 En este estudio, los animales de todos los grupos que recibieron 5 mg/kg una vez por semana perdieron en promedio un 10 % del peso corporal.

25 En esta línea celular, que muestra una expresión mínima de Nectina-4 en estudios FACS, el crecimiento tumoral está restringido por BCY8245 pero el tumor no experimenta regresión, enfatizando el requisito impulsado por dianas para una eficacia óptima.

Ejemplo 9.3: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto HT-1376 en ratones CB17-SCID

30 1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto HT-1376 en ratones CB17-SCID.

35 2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw

(continuación)

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
4	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw

3. Materiales

5 3.1 Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

10 Especie: *Mus musculus*
 Cepa: CB17-SCID
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 Número de animales: 41 ratones más repuesto

15 3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

25 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

30 Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

40 4.1 Cultivo celular

Las células tumorales HT-1376 se mantendrán en medio EMEM suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivarán rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogerán y se contarán para la inoculación del tumor.

4.2 Inoculación tumoral

50 A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales HT-1376 (5 x 10⁶) con Matrigel (1:1) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 153 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

55 4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %

(continuación)

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4. Recogida de muestras

- 5 Al final del estudio, el plasma del grupo 4 se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la última posología. El tumor del grupo 4 se recogió 2 horas después de la última dosificación. Los tumores de los grupos 1, 2 y 3 se recogieron 2 h después de la última dosificación.

5. Resultados

5.1. Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 19.

5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones CB17-SCID hembra portadores del xenoinjerto HT-1376 se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo
Días después del inicio del tratamiento

Gr.	Tratamiento	0	2	5	7	9	12	14
1	Vehículo, qw	153±16	266±30	398±41	529±56	721±76	908±91	1069±90
2	BCY8245, 3 mpk, qw	153±26	254±53	298±69	398±61	468±73	502±67	603±76
3	BCY8245, 3 mpk, biw	154±30	248±58	203±15	273±45	356±50	391±53	407±53
4	BCY8245, 5 mpk, qw	153±15	237±41	228±36	317±31	394±20	438±31	465±33

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto HT-1376 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 26: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
1	Vehículo, qw	1069±90	—	—	—
2	BCY8245, 3 mpk, qw	603±76	56,4	50,9	<i>p</i> <0,01
3	BCY8245, 3 mpk, biw	407±53	38,1	72,3	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	465±33	43,5	66,0	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto HT-1376. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 19 y en las Tablas 25 y 26.

El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 1069 mm³ el día 14. BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=603 mm³, TGI=50,9 %, *p*<0,01), 3 mg/kg, biw (TV=407 mm³, TGI=72,3 %, *p*<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=465 mm³, TGI=66,0 %, *p*<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa. En este estudio, BCY8245 a 5 mg/kg qw provocó una pérdida de peso corporal sobre el 10 % en los animales durante el programa de tratamiento.

Ejemplo 9.4: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 en ratones Balb/c desnudos**5 1. Objetivo del estudio**

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 en ratones Balb/c desnudos.

10 2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw

3. Materiales**15 3.1. Animales y condiciones de alojamiento****3.1.1. Animales**

Especie: *Mus musculus*
 Cepa: Balb/c desnudo
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 Número de animales: 41 ratones más repuesto

25 3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales**50 4.1. Cultivo celular**

Las células tumorales se mantuvieron en medio L-15 de Leibovitz suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

55 4.2. Inoculación del tumor

A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales MDA-MB-468 (10×10^6) en 0,2 ml de PBS suplementado con matrigel al 50 % para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 196 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	1	Disolver 10,56 mg de BCY8245 en 10,518 ml de tampón Histidina
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4. Recogida de muestras

En el día 21 de estudio, el plasma del grupo 2 se recogió a los 5 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la última posología. Los tumores de los grupos 1 y 3 se recogieron 2 h después de la última dosificación. Los animales del grupo 4 se mantuvieron corriendo durante otros 21 días sin ninguna dosis y los tumores de estos grupos se recolectaron el día 42.

5. Resultados

5.1. Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 20.

5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468 se muestra en la Tabla 27 y 28.

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 21 después del inicio del tratamiento.

Tabla 27: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 0 al día 21)

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Vehículo, qw	199±6	217±9	235±15	274±14	291±14	314±20	348±24	374±33	398±39	447±39
2	BCY8245, 3 mpk, qw	194±12	192±26	184±20	131±20	113±17	104±13	94±25	81±23	87±23	85±31
3	BCY8245, 3 mpk, biw	195±33	193±27	154±20	103±20	83±16	67±14	49±11	45±14	32±12	22±4
4	BCY8245, 5 mpk, qw	199±28	193±11	135±4	98±5	58±5	49±5	47±2	37±4	35±3	29±3

Tabla 28: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 23 al día 42)

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		23	25	28	32	35	39	42
4	BCY8245, 5 mpk, qw	35±5	48±5	37±7	28±6	24±4	28±6	26±6

Tabla 29: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> con
1	Vehículo, qw	447±39	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	85±31	18,9	144,2	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245, 3 mpk, biw	22±4	4,9	169,8	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	29±3	6,6	168,4	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.
b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

5 En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 20 y en las Tablas 27 a 29.

10 El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 447 mm³ el día 21. BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=85 mm³, TGI=144,2 %, *p*<0,001), 3 mg/kg, biw (TV=22 mm³, TGI=169,8 %, *p*<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=29 mm³, TGI=168,4 %, *p*<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa de manera dependiente de la dosis o de la frecuencia de la dosis.

15 La posología de los grupos de 5 mg/kg se suspendió a partir del día 21, los tumores no mostraron ninguna recaída durante el programa de seguimiento adicional de 3 semanas. En esta línea celular, que muestra una expresión alta de Nectina-4 en estudios FACS, BCY8245 provoca la regresión del tumor enfatizando la naturaleza impulsada por diana de la eficacia óptima.

20 Ejemplo 9.5: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto NCI-H292 en ratones Balb/c desnudos

1. Objetivo del estudio

25 El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto NCI-H292 en ratones Balb/c desnudos.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (μl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw

30 3. Materiales

3.1. Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

35 Especie: *Mus musculus*
Cepa: Balb/c desnudo
Edad: 6-8 semanas
Sexo: hembra
40 Peso corporal: 18-22 g
Número de animales: 41 ratones más repuesto

3.1.2. Condiciones de alojamiento

45 Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o

5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

5 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

10 Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

15 Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

20 4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1. Cultivo celular

25 Las células tumorales NCI-H292 se mantuvieron *in vitro* como un cultivo en monocapa en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron de forma rutinaria dos veces por semana mediante tratamiento con tripsina-EDTA. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

30 4.2. Inoculación del tumor

35 A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales NCI-H292 (10×10^6) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 162 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	1	Disolver 10,56 mg de BCY8245 en 10,518 ml de tampón Histidina
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

40 4.4. Recogida de muestras

Al final del estudio, los tumores de todos los grupos se recogieron 2 h después de la última posología.

45 5. Resultados

5.1 Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 21.

50 5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H292 se muestra en la Tabla 30.

55 **Tabla 30: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo**

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Vehículo, qw	161±2	270±14	357±14	448±17	570±16	720±36	948±61
2	BCY8245, 3 mpk, qw	160±5	220±11	266±15	218±23	167±10	161±36	149±43
3	BCY8245, 3 mpk, biw	162±13	243±19	211±12	101±11	100±8	87±7	65±3
4	BCY8245, 5 mpk, qw	160±9	176±7	191±3	105±8	82±3	91±14	83±8

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto NCI-H292 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 31: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
1	Vehículo, qw	948±61	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	149±43	15,8	101,4	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245, 3 mpk, biw	65±3	6,9	112,2	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	83±8	8,8	109,8	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto NCI-H292. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 21 y en las Tablas 30 y 31.

El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 948 mm³ el día 14. BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=149 mm³, TGI=101,4 %, *p*<0,001), 3 mg/kg, biw (TV=65 mm³, TGI=112,2 %, *p*<0,001) y 5 mg/kg, qw (TV=83 mm³, TGI=109,8 %, *p*<0,001) produjo una actividad antitumoral significativa.

Todos los artículos de prueba a 3 mg/kg, qw, 3 mg/kg, biw y 5 mg/kg, qw mostraron actividad antitumoral comparable, la eficacia no mejoró aún más al aumentar la dosis o la frecuencia de la dosis.

En este estudio, los ratones de todos los grupos mantuvieron bien el peso corporal.

En esta línea celular, que muestra una expresión alta de Nectina-4 en estudios FACS, BCY8245 provoca la regresión del tumor enfatizando la naturaleza impulsada por diana de la eficacia óptima.

Ejemplo 9.6: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto NCI-H526 en ratones Balb/c desnudos

1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto NCI-H526 en ratones Balb/c desnudos.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (μl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	3	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3	10	iv	qw

(continuación)

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
3	BCY8245	3	3	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5	10	iv	qw

3. Materiales

5 3.1. Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

10 Especie: *Mus musculus*
 Cepa: Balb/c desnudo
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 Número de animales: 21 ratones más repuesto

15 3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

25 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

30 Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

35 Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

40 4.1 Cultivo celular

Las células tumorales NCI-H526 se mantuvieron en medio suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

4.2. Inoculación del tumor

50 A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales NCI-H526 ($5,0 \times 10^6$) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 21 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 181 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

55 4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %

(continuación)

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
BCY8245	0,5	Diluir 400 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 µl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 µl de tampón Histidina

4.4. Recogida de muestras

- 5 Al final del estudio el día 14, todos los tumores se recogieron para FFPE.

5. Resultados

5.1. Curvas de crecimiento tumoral

- 10 La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 22.

5.2. Trazo del volumen tumoral

- 15 El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto NCI-H526 se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Grupo	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	4	7	9	12	14
1	Vehículo, qw	181±32	262±56	431±90	563±72	729±115	1076±155	1365±208
2	BCY8245, 3 mpk, qw	180±32	256±51	403±72	545±68	657±83	1019±155	1205±79
3	BCY8245, 3 mpk, biw	182±43	232±49	308±79	440±112	530±121	810±197	1109±250
4	BCY8245, 5 mpk, qw	180±52	209±66	236±72	383±119	375±115	365±79	476±103

20 5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto NCI-H526 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 33: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i>
1	Vehículo, qw	1365±208	—	—	—
2	BCY8245, 3 mpk, qw	1205±79	88,3	13,4	<i>p</i> >0,05
3	BCY8245, 3 mpk, biw	1109±250	81,3	21,6	<i>p</i> >0,05
4	BCY8245, 5 mpk, qw	476±103	34,9	75,0	<i>p</i> <0,01

a. Media ± SEM;

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

- 30 En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto NCI-H526. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 22 y en las Tablas 32 y 33.

- 35 El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 1365³ el día 14 después del inicio del tratamiento. BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=1205 mm³, TGI=13,4 %, *p*>0,05) y 3 mg/kg, biw (TV=1109 mm³, TGI=21,6 %, *p*>0,05) mostró una ligera actividad antitumoral, BCY8245 a 5 mg/kg, qw (TV=476 mm³, TGI=75,0 %, *p*<0,01) mostró actividad antitumoral significativa. En este estudio, BCY8245 a 5 mg/kg de peso corporal provocó una pérdida de más del 10 % del peso corporal del animal. En esta línea celular, que muestra una expresión mínima de Nectina-4 en estudios FACS, el crecimiento tumoral está restringido por BCY8245 pero el tumor no experimenta regresión, enfatizando el requisito

impulsado por dianas para una eficacia óptima.

Ejemplo 9.7: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto Panc2.13 en ratones Balb/c desnudos

1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto Panc2.13 en ratones Balb/c desnudos.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosificación (µl/g)	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	5	--	10	iv	qw
2	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	qw
3	BCY8245	3	3 mg/kg	10	iv	biw
4	BCY8245	3	5 mg/kg	10	iv	qw

3. Materiales

3.1. Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

Especie: *Mus musculus*
 Cepa: Balb/c desnudo
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 Número de animales: 41 ratones más repuesto

3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 3 o 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1. Cultivo celular

Las células tumorales Panc2.13 se mantendrán en medio RPMI1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 15 % y 10 unidades/ml de insulina recombinante humana a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células tumorales se subcultivarán rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogerán y se contarán para la inoculación del tumor.

4.2. Inoculación del tumor

A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales Panc2.13 (5×10^6) con Matrigel (1:1) en 0,2 ml de PBS para el desarrollo del tumor. 41 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 149 mm^3 . La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Con. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	0,5	Diluir 400 μl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 400 μl de tampón Histidina
BCY8245	0,3	Diluir 240 μl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 560 μl de tampón Histidina

4.4. Recogida de muestras

Al final del estudio, los tumores de todos los grupos se recogieron 2 h después de la última posología.

5. Resultados

5.1. Curvas de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 23.

5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto Panc2.13 se muestra en la Tabla 34.

Tabla 34: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Vehículo, qw	149 $\pm$ 12	202 $\pm$ 12	240 $\pm$ 9	321 $\pm$ 17	410 $\pm$ 27	479 $\pm$ 32	545 $\pm$ 17
2	BCY8245, 3 mpk, qw	149 $\pm$ 34	160 $\pm$ 33	191 $\pm$ 39	215 $\pm$ 53	242 $\pm$ 62	259 $\pm$ 59	271 $\pm$ 54
3	BCY8245, 3 mpk, biw	148 $\pm$ 46	170 $\pm$ 38	204 $\pm$ 57	216 $\pm$ 56	236 $\pm$ 59	241 $\pm$ 60	231 $\pm$ 57
4	BCY8245, 5 mpk, qw	149 $\pm$ 18	180 $\pm$ 11	231 $\pm$ 33	242 $\pm$ 34	248 $\pm$ 40	231 $\pm$ 37	238 $\pm$ 40

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto Panc2.13 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 14 después del inicio del tratamiento.

Tabla 35: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm^3) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
1	Vehículo, qw	545 $\pm$ 17	--	--	--
2	BCY8245, 3 mpk, qw	271 $\pm$ 54	49,6	69,2	<i>p</i> <0,01
3	BCY8245, 3 mpk, biw	231 $\pm$ 57	42,3	79,1	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 mpk, qw	238 $\pm$ 40	43,6	77,5	<i>p</i> <0,001

a. Media $\pm$ SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto Panc2.13. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 23 y en las Tablas 34 y 35.

- 5 El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 545 mm³ el día 14. BCY8245 a 3 mg/kg, qw (TV=271 mm³, TGI=69,2 %, $p<0,01$), 3 mg/kg, biw (TV=231 mm³, TGI=79,1 %, $p<0,001$) y 5 mg/kg, qw (TV=238 mm³, TGI=77,5 %, $p<0,001$) produjo una actividad antitumoral significativa. En este estudio, los animales de todos los grupos que recibieron 5 mg/kg una vez por semana perdieron en promedio un 15 % del peso corporal. En esta línea celular, que muestra solo una expresión moderada de Nectina-4 en estudios FACS, el crecimiento del tumor está restringido por BCY8245 pero el tumor no experimenta regresión.

Ejemplo 9.8: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 en ratones Balb/c desnudos

1. Objetivo del estudio

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de BCY8245 y BCY8245 en combinación con BCY8234 en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 en ratones Balb/c desnudos para determinar el papel que debe desempeñar la unión a diana en la eficacia óptima.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	—	4	i.v.	Qw, 3 semanas
2	BCY8245	0,3	4	i.v.	Qw, 3 semanas
3	BCY8245	1	4	i.v.	Qw, 3 semanas
4	BCY8245	3	4	i.v.	Qw, 3 semanas
5	BCY8245+BCY8234	1+300	4	i.v.	Qw, 3 semanas
6	BCY8245+BCY8234	3+300	4	i.v.	Qw, 3 semanas

Nota: N, el número de animales en cada grupo.

3. Materiales

3.1. Animales y condiciones de alojamiento

3.1.1. Animales

- 30 Especie: *Mus musculus*
 Cepa: Balb/c desnudo
 Edad: 6-8 semanas
 Sexo: hembra
 Peso corporal: 18-22 g
 35 Número de animales: 36 ratones más repuesto

3.1.2. Condiciones de alojamiento

40 Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 4 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

45 Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

50 Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

- 5 Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1. Cultivo celular

Las células tumorales se mantuvieron en medio L-15 de Leibovitz suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 0 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

4.2. Inoculación del tumor

A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales MDA-MB-468 (10 x 10⁶) en 0,2 ml de PBS suplementado con matrigel al 50 % para el desarrollo del tumor. 36 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 186 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Pureza	Conc. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	-	Histidina 25 mM, pH 7, sacarosa al 10 %
BCY8245	99,4 %	1	Disolver 5,0 mg de BCY8245 en 4,97 ml de tampón Histidina ¹
		0,03	Diluir 36 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 1164 µl de tampón Histidina
		0,1	Diluir 120 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 1080 µl de tampón Histidina
		0,3	Diluir 360 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 840 µl de tampón Histidina
BCY8234	98,10 %	30	Disolver 147 mg de BCY8234 en 4,807 ml de tampón Histidina

4.4. Recogida de muestras

En el día 21 de estudio, los tumores del grupo 5 y 6 se recogieron para FFPE. Al final del estudio, los tumores del grupo 3 se recogieron para FFPE.

5. Resultados

5.1. Curva de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 24.

5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468 se muestra en las Tablas 36 a 38.

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 21 después del inicio del tratamiento.

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 24 y en las Tablas 36 a 39.

El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 420 mm³ el día 21. BCY8245 a 1 mg/kg, qw (TV=204 mm³, TGI=92,1 %, $p<0,001$), 3 mg/kg, qw (TV=27 mm³, TGI=164,9 %, $p<0,001$) produjo una actividad antitumoral significativa de manera dependiente de la dosis. BCY8245 a 0,3 mg/kg qw o biw no mostró ninguna actividad antitumoral.

- 5 BCY8245 a 1 mg/kg, qw y 3 mg/kg, qw en combinación con BCY8234 (el péptido afín libre de toxina) 300 mg/kg, qw produjo una actividad antitumoral significativa (TV=242 mm³, TGI=75,4 %, $p<0,01$) produjo una actividad antitumoral significativa. Al comparar con BCY8245 solo, la actividad antitumoral de BCY8245 a 3 mg/kg fue antagonizada por BCY8234 a 300 mg/kg ($p<0,001$). Esta reducción en la eficacia del péptido libre de toxinas que compite demuestra la
- 10 importancia de la unión a diana para una eficacia óptima. Durante el siguiente control estricto de monitorización, los ratones tratados con BCY8245 1 mg/kg qw mostraron una recaída tumoral evidente, mientras que los ratones tratados con BCY8245 3 mg/kg qw no mostraron ninguna recaída tumoral

Tabla 35: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 0 al día 21)

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Vehículo, qw	182±15	196±18	217±18	260±15	283±19	302±26	335±27	362±28	386±31	420±97
2	BCY8245 0,3 mpk, qw	188±21	189±19	211±21	235±28	252±25	253±33	275±26	277±27	295±26	300±27
3	BCY8245 1 mpk, qw	185±21	187±22	183±22	190±28	205±29	195±27	201±25	197±22	218±24	204±19
4	BCY8245 3 mpk, qw	181±14	171±17	163±10	141±21	119±16	92±5	66±4	58±2	41±2	27±1
5	BCY8245+BCY8234 1+300 mpk, qw	184±15	189±22	194±28	212±30	221±34	221±39	223±36	211±38	221±51	242±67
6	BCY8245+BCY8234 3+300 mpk, qw	184±16	178±57	193±36	197±46	179±44	138±41	137±32	114±24	110±24	99±18

Tabla 37: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 23 al día 32)

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento				
		23	25	28	30	32
1	Vehículo, qw	434±35	460±38	504±32	535±46	548±51
2	BCY8245 0,3 mpk, qw	284±14	268±10	254±15	240±21	241±32
3	BCY8245 1 mpk, qw	200±16	199±13	210±6	221±14	239±16
4	BCY8245 3 mpk, qw	22±3	19±3	20±3	15±2	15±1

Tabla 38: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 35 al día 91)

Días	Grupo 1, Vehículo, qw, dosificado con BCY8245 5 mpk en PG-D32	Grupo 2, BCY8245, 0,3 mpk, qw	Grupo 3 BCY8245, 1 mpk, qw	Grupo 4, BCY8245, 3 mpk, qw
35	455±81	237±33	255±15	19±2
37	373±92	246±40	292±19	16±2
39	247±48	248±37	304±36	14±1
42	134±18	245±48	314±42	14±2
44	108±3	251±48	327±42	18±4
46	79±3	248±61	342±55	19±4
49	63±8	250±65	356±59	20±4
51	62±5	264±68	374±71	18±5
53	53±12	268±81	381±87	22±4
56	52±13	271±87	416±104	21±4
58	58±0	267±95	433±113	20±5
60	61±7	270±108	464±119	18±6
64	71±23	276±132	532±154	23±6
67	66±14	269±137	550±162	23±5
71	73±5	280±155	565±170	24±7
74	82±4	295±167	594±173	27±8
78	90±8	313±194	612±195	23±6
81	104±17	291±192	639±206	27±8
84	110±1	301±194	695±234	34±7
88	106±7	277±194	743±236	32±7
91	110±3	293±209	771±240	26±6

5

Tabla 39: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de comparado con el vehículo	p	Combo comparado con BCY8245
1	Vehículo, qw	420±37	--	--	--	--	--
2	BCY8245 0,3 mpk, qw	300±27	71,4	52,7	p>0,05		
3	BCY8245 1 mpk, qw	204±19	48,6	92,1	p<0,001		
4	BCY8245 3 mpk, qw	27±1	6,5	164,9	p<0,001		

(continuación)

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo	<i>Combo</i> comparado con BCY8245
5	BCY8245+BCY8234 1+300 mpk, qw	242±67	57,8	75,4	<i>p</i> <0,01	<i>p</i> >0,05
6	BCY8245+BCY8234 3+300 mpk, qw	99±18	23,5	135,9	<i>p</i> <0,001	<i>P</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

Ejemplo 9.9: Estudio de eficacia *in vivo* de los artículos de prueba en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 en ratones Balb/c desnudos**1. Objetivo del estudio**

El objetivo de la investigación es evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de BCY8245 solo o en combinación con BCY8234 en el tratamiento del xenoinjerto MDA-MB-468 en ratones Balb/c desnudos.

2. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	Vía de dosificación	Pauta
1	Vehículo	--	5	i.v.	Qw, 3
2	BCY8245	1	5	i.v.	Qw, 3
3	BCY8245	3	5	i.v.	Qw, 3

Nota: N, el número de animales en cada grupo.

3. Materiales**3.1 Animales y condiciones de alojamiento****3.1.1. Animales**Especie: *Mus musculus*

Cepa: Balb/c desnudo

Edad: 6-8 semanas

Sexo: hembra

Peso corporal: 18-22 g

Número de animales: 20 ratones más repuesto

3.1.2. Condiciones de alojamiento

Los ratones se mantuvieron en jaulas de ventilación individuales a temperatura y humedad constantes con 5 animales en cada jaula.

- Temperatura: 20-26 °C.
- Humedad 40-70 %.

Jaulas: Hechas de policarbonato. El tamaño es de 300 mm x 180 mm x 150 mm. El material de lecho es mazorca de maíz, que se cambia dos veces por semana.

Dieta: Los animales tuvieron libre acceso a alimentos granulados secos esterilizados por irradiación durante todo el período del estudio.

Agua: Los animales tenían libre acceso a agua potable esterilizada.

Identificación de la jaula: Los marcadores de identificación de cada jaula contenían la siguiente información: número de animales, sexo, cepa, la fecha de recepción, tratamiento, número de estudio, número de grupo y la fecha de inicio del tratamiento.

Identificación del animal: Los animales fueron marcados mediante un código en las orejas.

4. Métodos y procedimientos experimentales

4.1 Cultivo celular

Las células tumorales se mantuvieron en medio L-15 de Leibovitz suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 0 % en aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

4.2. Inoculación del tumor

A cada ratón se le inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho células tumorales MDA-MB-468 (10×10^6) en 0,2 ml de PBS suplementado con matrigel al 50 % para el desarrollo del tumor. 20 animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 464 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo se mostraron en la tabla de diseño experimental.

4.3. Preparación de la formulación del artículo de prueba

Artículo de prueba	Pureza	Conc. (mg/ml)	Formulación
Vehículo	-	-	Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %
BCY8245	99,7 %	1	Disolver 5,0 mg de BCY8245 en 4,985 ml de tampón Histidina ¹
		0,1	Diluir 140 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 1260 µl de tampón Histidina
		0,3	Diluir 420 µl de solución madre de BCY8245 1 mg/ml con 980 µl de tampón Histidina
BCY8234	98,10 %	30	Disolver 147 mg de BCY8234 en 4,807 ml de tampón Histidina
1. Histidina 25 mM pH 7 sacarosa al 10 %			

4.4. Recogida de muestras

Al final del estudio, los tumores del grupo 3 se recogieron para FFPE.

5. Resultados

5.1. Curva de crecimiento tumoral

La curva del crecimiento tumoral se muestra en la Figura 25.

5.2. Trazo del volumen tumoral

El volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones desnudos Balb/c hembra portadores del xenoinjerto MDA-MB-468 se muestra en las Tablas 40 a 42.

5.3. Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

La tasa de inhibición del crecimiento tumoral de los artículos de prueba en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468 se calculó en función de las mediciones del volumen tumoral el día 28 después del inicio del tratamiento.

6. Resumen de resultados y análisis

En este estudio, la eficacia terapéutica de los artículos de prueba se evaluó en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-468. Los volúmenes tumorales medidos de todos los grupos de tratamiento en varios puntos temporales se muestran en la Figura 25 y en las Tablas 40 a 43.

El tamaño inicial del tumor fue intencionalmente mayor que el usado previamente para determinar si BCY8245 mostraba eficacia en este tamaño más grande. El tamaño tumoral medio de ratones tratados con vehículo alcanzó 773 mm³ el día 28. BCY8245 a 1 mg/kg, qw (TV=384 mm³, TGI=126,6 %, $p<0,001$) y 3 mg/kg, qw (TV=50 mm³, TGI=234,6 %, $p<0,001$) produjo una actividad antitumoral significativa de manera dependiente de la dosis el día 28. Entre ellos, los ratones tratados con BCY8245, 3 mg/kg qw mostraron cierta recaída del tumor después de suspender el tratamiento, la posología adicional a partir del día 76 no funcionó en la regresión completa del tumor.

BCY8245 a 3 mg/kg, qw en combinación con BCY8234 300 mg/kg, qw produjo una actividad antitumoral significativa (TV=55 mm³, TGI=234,0 %, $p<0,001$) el día 28 y los tumores no mostraron ninguna recaída durante todo el control estricto de monitorización.

- 5 Los ratones del grupo del vehículo tratados con 10 mg/kg de Nectina-4 ADC o 5 mg/kg de BCY8245 y los ratones del grupo 2 (BCY8245, 1 mpk, qw) tratados con 5 mg/kg de BCY8245 en PG-D28 mostraron una regresión tumoral efectiva en las siguientes 3 semanas, después de eso, los tumores volvieron a crecer en las siguientes 4 semanas cuando se retiró el fármaco.
- 10 BCY8245 fue capaz de provocar la regresión tumoral en tumores de aproximadamente 450 mm³, pero también cuando se administra al grupo que previamente recibió el vehículo, en tumores con un volumen de partida de aproximadamente 770 mm³.

Tabla 40: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 0 al día 28)

Gr	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento													
		0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28	
1	Vehículo, qw	466±8 9	494±9 4	529±10 6	548±10 9	574±11 7	602±13 0	632±13 3	659±12 9	686±13 3	706±14 5	741±14 8	769±15 7	773±15 5	
2	BCY8245 qw	466±2 2	480±2 4	453±29	474±25	446±31	461±34	460±28	433±37	412±32	430±32	421±34	382±37	384±41	
3	BCY8245 qw	464±2 8	451±2 4	388±25	333±30	284±26	168±24	129±20	93±23	83±17	71±19	60±17	49±17	50±17	
4	BCY8245+BCY823 4 (3+300) mpk, qw	467±4 5	457±4 6	401±47	389±42	309±25	205±9	150±9	125±5	95±3	90±5	78±5	66±4	55±5	

Tabla 41: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 30 al día 75)

Días después del inicio del tratamiento	Grupo 1, Vehículo, dosificado con 5 mpk BCY8245 en PG-D28	Grupo 2, BCY8245, 1 mpk, cambio en 5 mpk en PG-D28	Grupo 3, BCY8245, 3mpk, qw	Grupo 4, BCY8245+BCY8234 3+300 mpk, qw
30	625±27	351±42	44±18	49±8
33	477±31	213±29	43±20	33±10
35	405±65	151±18	44±20	31±10
37	237±36	98±16	50±24	31±10
40	148±33	89±17	55±29	36±14
42	142±33	95±16	66±32	40±13
44	132±69	103±20	71±33	35±11
48	146±100	106±21	80±36	43±14
51	171±122	103±21	91±43	45±18
55	227±166	104±20	108±53	42±13
56	264±182	120±23	125±58	43±12
62	288±206	145±29	146±70	40±12
65	316±212	163±31	147±74	41±14
68	347±215	173±32	155±81	46±13
72	368±242	180±36	170±89	45±20
75	385±245	196±40	223±115	43±19

Tabla 42: Trazo del volumen tumoral a lo largo del tiempo (Día 79 al día 103)

Gr.	Tratamiento	Días después del inicio del tratamiento							
		79	82	86	89	93	96	100	103
3	BCY8245 3 mpk, qw	221±118	198±107	185±105	180±102	155±91	166±95	221±119	250±125

Tabla 43: Análisis de inhibición del crecimiento tumoral

Gr	Tratamiento	Volumen tumoral (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Valor de <i>p</i> comparado con el vehículo
1	Vehículo, qw	773±155	--	--	--
2	BCY8245 1 mpk, qw	384±41	49,7	126,6	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245 3 mpk, qw	50±17	6,4	234,6	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245+BCY8234 3+300 mpk, qw	55±5	7,1	234,0	<i>p</i> <0,001

a. Media ± SEM.

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula dividiendo el volumen tumoral promedio del grupo tratado por el volumen tumoral promedio del grupo de control (T/C).

Ejemplo 10: Estudios PK *in vivo*.

A los animales con xenoinjerto MDA-MB-468 se les inyectó BCY8245 (BT8009) a 3 mg/kg. En diversos puntos temporales, los animales fueron sacrificados y se les extrajo plasma y tumores y se congelaron rápidamente. Las muestras fueron analizadas para MMAE. Los niveles en plasma de BT8009 (BCY8245) provienen de estudios PK históricos. Las concentraciones de MMAE en plasma, MMAE en tumor y BT8009 en plasma se muestran en la Figura 33. MMAE se retuvo en el tumor durante más tiempo que en el plasma, lo que respalda la hipótesis de que la exposición sistémica es significativamente menor que la exposición al tumor.

Ejemplo 11: Ensayo HCS.

El ensayo HCS se usó en el estudio de unión de Nectina-4 BDC. Las células se incubaron con el agente de prueba y

a continuación se lavaron. La detección se realizó mediante un anticuerpo fluorescente contra MMAE. Las células MDA-MB-468 muestran una expresión moderada de Nectina-4 proporcionando 20000 células las mejores imágenes. Las células NCI-H292 muestran baja expresión en este ensayo, la detección de MMAE fue mala incluso con 20000 células. Los datos de HCS sobre la línea celular MDA-MB-468 se muestran en la Figura 34 y la Tabla 44.

5

Tabla 44

Artículo de prueba	Intensidad de fluorescencia máxima	Kd (nM)	Kd histórico (nM)
Nectina-4 ADC	33,63	0,2	0,28±0,07
BCY8245	13,34	3,52	5,18
MMAE	2,95	>10000	>10000

Nectina-4 ADC y BCY8245 se retuvieron en las células y se colocaron con una tinción de membrana. BCY8781 y MMAE mostraron una retención mínima. Los Kd de todos los compuestos en la línea celular MDA-MB-468 fueron consistentes con los datos históricos. El Nectina-4 ADC mostró una afinidad de unión detectable en la línea celular MDA-MB-468. BCY8245 mostró una afinidad nanomolar de un solo dígito con un B_{máx} menor que para el Nectina-4 ADC. Esta intensidad de fluorescencia máxima reducida se debe a que el Nectina-4 ADC tiene una relación MMAE/fármaco de 4, mientras que BCY8245 tiene una relación MMAE/fármaco de 1. BCY8781 mostró solo una afinidad de unión muy débil en la línea celular MDA-MB-468, mientras que MMAE no mostró una afinidad de unión casi detectable en la línea celular MDA-MB-468.

10

15

Ejemplo 12: Eficacia *in vivo* de BCY8245 en dos modelos PDX de cáncer de pulmón

Fin

20

Evaluar la eficacia de BCY8245 en un modelo PDX de carcinoma de células escamosas no microcíticas y adenocarcinoma (ambos carcinomas de células no microcíticas).

Animales

25

Especie: *Mus musculus*

Cepa: Balb/c desnudo

Edad: 6-8 semanas

Sexo: hembra

30

Peso corporal: 18-22

Agentes en prueba

BCY8245 y Nectina-4 ADC o BCY8781

Animales de estudio previo

35

A cada ratón se le inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho el fragmento tumoral LU-01-0007 o LU-01-0412 (~30 mm³) para el desarrollo de tumores. Los animales se aleatorizaron cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 161 mm³ (LU-01-0007) o 147 mm³ (LU-01-0412).

Mediciones en vida y los criterios de valoración

40

Se comprobó a los animales diariamente para detectar cualquier efecto del crecimiento del tumor y los tratamientos sobre la conducta normal tales como movilidad, consumo de alimentos y agua (solo mirando), aumento/pérdida de peso corporal, enmarañamiento de ojos y cabello y cualquier otro efecto anormal según lo indicado en el protocolo. La muerte y los signos clínicos observados se registraron en función del número de animales dentro de cada subconjunto.

45

El criterio de valoración principal era ver si se podía retrasar el crecimiento del tumor o curar a los ratones. El volumen tumoral se midió tres veces a la semana en dos dimensiones usando un calibre y el volumen se expresó en mm³ usando la fórmula: $V = 0,5 a \times b^2$ donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. A continuación el tamaño tumoral se usó para los cálculos de los valores de T/C. El valor de T/C (en porcentaje) es una indicación de la eficacia antitumoral; T y C son los volúmenes medios de los grupos tratados y de control, respectivamente, en un día dado.

50

TGI se calculó para cada grupo usando la fórmula: $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$; T_i es el volumen tumoral promedio de un grupo de tratamiento en un día dado, T₀ es el volumen tumoral promedio del grupo de tratamiento el día del inicio del tratamiento, V_i es el volumen tumoral promedio del grupo de control de vehículo el mismo día que T_i y V₀ es el volumen tumoral promedio del grupo de vehículo el día del inicio del tratamiento.

55

Los resultados de estos estudios se muestran en las Figuras 26 y 27.

Lu-01-0412 (Figura 26): BCY8245 produjo una eficacia relacionada con la dosis en este modelo PDX con una reducción en la tasa de crecimiento del tumor a 1 mg/kg qw pero una marcada regresión del tumor a 3 mg/kg qw hasta el valor inicial. Después de suspender la dosificación (día 21), 5/6 animales no mostraron recrecimiento del tumor hasta 105 días después del inicio del estudio. El único animal que mostró recrecimiento respondió a 3 mg/kg de BCY8245 y mostró una regresión restaurada al valor inicial. BCY8781, el BDC de no unión, produjo una enfermedad estable a 3 mg/kg y al suspender la dosificación, el tumor creció rápidamente al mismo ritmo que el grupo tratado con el vehículo, enfatizando la eficacia aumentada que la unión de Nectina-4 proporciona a estos agentes. Los tumores grandes (el grupo tratado con vehículo) retrocedieron en respuesta a una dosis única de BCY8245 o BCY8781.

LU-01-0007 (Figura 27): BCY8245 produjo una eficacia relacionada con la dosis produciendo 1 mg/kg una enfermedad estable y produciendo 3 mg/kg una regresión completa. La dosificación tuvo que mantenerse hasta el día 56 para lograr una regresión completa (cuando se cesó la dosificación). En este grupo no se observó recrecimiento del tumor más allá (manteniéndose este último hasta 126 días después del inicio del estudio). El Nectina-4 ADC mostró un grado similar de eficacia. El grupo con enfermedad estable tratada con 1 mg/kg respondió a aumentos en la dosis (3 y 5 mg/kg) sugiriendo que las dosis bajas de BCY8245 no conducen al desarrollo de resistencia.

Ejemplo 13: Evaluación *in vivo* de BCY8245 en modelos PDX de bajo paso de cáncer de mama, esofágico y de vejiga humanos en ratones inmunodeprimidos.

Fin

Evaluar la actividad antitumoral del agente Biciclo en modelos de injerto tumoral Champions de bajo pase de cáncer de mama, esofágico y de vejiga en ratones inmunodeprimidos.

Sistema de prueba

Especie: Ratón

Cepa: Desnudo-Foxn1nu atímico (inmunodeprimido)

Fuente: Envigo: Indianápolis, Indiana

Género: Hembra

Edad diana al inicio de la dosificación: Al menos 6-8 semanas de edad

Peso diana al inicio de la dosificación: Al menos 18 gramos

Período de aclimatación: 3 días

Diseño experimental

Animales de estudio previo: Cuando haya suficientes animales de cría que alcancen 1,0 - 1,5 cm³, se extraerán tumores para reimplantarlos en animales de estudio previo. A los animales del estudio previo se les implantarán unilateralmente en el flanco izquierdo fragmentos de tumor extraídos de animales de reserva. A cada animal se le implanta a partir de un lote de pasaje específico y se documenta.

Animales del estudio: Los volúmenes tumorales previos al estudio se registran para cada experimento entre siete y diez días después de la implantación. Cuando los tumores alcanzan un volumen tumoral promedio de 150-300 mm³, los animales se emparejarán según el volumen tumoral en grupos de tratamiento o de control que se usarán para la posología y la posología se iniciará el Día 0.

Agentes en prueba

BCY8245 y Nectina-4 Conjugado de anticuerpo y fármaco, comparación con el control de vehículo. Puede incluirse el agente de cuidado convencional Docetaxel. Todos los agentes deben administrarse qw por vía intravenosa, las dosis se indican en gráficos.

Mediciones en vida

Volumen tumoral de Eficacia: Los volúmenes tumorales se tomarán dos veces por semana. Se tomará un volumen tumoral final el día en que el estudio alcance el criterio de valoración. Si es posible, se tomará un volumen final del tumor si se encuentra un animal moribundo.

Pesos de los animales de eficacia: Los animales se pesarán dos veces por semana. Se tomará un peso final el día en que el estudio llegue al criterio de valoración o si el animal se encuentra moribundo, si es posible. A los animales que presenten una pérdida de peso $\geq 10\%$ en comparación con el día 0 se les proporcionará DietGel® a demanda. Cualquier animal que presente una pérdida de peso neto $>20\%$ durante un período que dure 7 días o si los ratones muestran una pérdida de peso neto $>30\%$ en comparación con el día 0 se considerará moribundo y se sacrificará.

Análisis de los datos

Toxicidad del agente: Comenzando el Día 0, los animales serán observados diariamente y pesados dos veces por

semana usando una balanza digital; incluyendo los datos pesos en gramos individuales y medios (Pe medio $\pm$ SEM), se registrará el cambio porcentual de peso medio frente al día 0 (%vD0) para cada grupo y se graficará el %vD0 al finalizar el estudio. Las muertes de animales se registrarán diariamente y se designarán como relacionadas con los fármacos (D), técnicas (T), relacionadas con el tumor (B) o desconocidas (U) basándose en la pérdida de peso y la observación macroscópica; los grupos de agente único o de combinación que informen una mortalidad media de %vD0 >20 % y/o >10 % se considerarán superiores a la dosis máxima tolerada (MTD) para ese tratamiento en el régimen evaluado. El %vD0 medio máximo (peso nadir) para cada grupo de tratamiento se informa al finalizar el estudio.

Eficacia del agente

Inhibición del crecimiento tumoral: Empezando el Día 0, las dimensiones tumorales se miden dos veces por semana con un calibre digital y se registran datos que incluyen volúmenes tumorales individuales y medios estimados (TV medio $\pm$ SEM) para cada grupo; el volumen tumoral se calcula usando la fórmula (1): $TV = ancho^2 \times largo \times 0,52$. Al finalizar el estudio, se calcularán y se informarán valores de inhibición porcentual del crecimiento tumoral (%TGI) para cada grupo de tratamiento (T) frente a control (C) usando mediciones tumorales iniciales (i) y finales (f) mediante la fórmula (2): $\%TGI = 1 - (Tf - Ti) / (Cf - Ci)$. Los ratones individuales que informen un volumen tumoral ≤ 30 % de la medición del Día 0 durante dos mediciones consecutivas se considerarán que responden al tratamiento parciales (PR). Los ratones individuales que carecen de tumores palpables (0,00 mm³ para dos mediciones consecutivas) serán clasificados como que responden al tratamiento completos (CR); un CR que persista hasta la finalización del estudio se considerará un superviviente libre de tumor (TFS). El tiempo de duplicación del tumor (DT) se determinará para los grupos tratados con vehículo usando la fórmula $DT = (Df - Di) * \log 2 / (\log TVf - \log TVi)$ donde D = Día y TV = Volumen tumoral. Todos los datos recopilados en este estudio se gestionan electrónicamente y se almacenan en un sistema de servidor redundante.

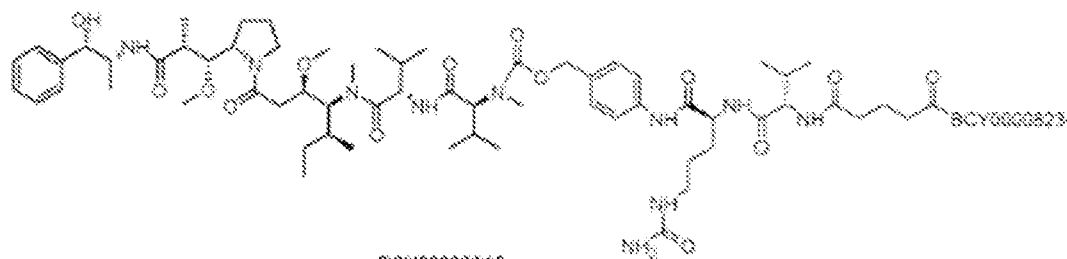
Los resultados de estos estudios se muestran en las Figuras 28 a 31.

Se probó BCY8245 en cuatro modelos PDX de bajo pasaje que representan cáncer de vejiga (CTG-1771), un cáncer de mama positivo para Her2 positivo y negativo para estrógeno y progesterona (CTG-1171), un cáncer de mama triple negativo (CTG-1106) y un cáncer de esófago (CTG-0896). En todos estos modelos, BCY8245 mostró una excelente eficacia evocando regresión tumoral y en tres de los cuatro regresión completa al valor inicial. La eficacia fue comparable al ADC en todos los casos y superior o igual a Docetaxel SOC. En todos los modelos BCY8245 fue mejor tolerado que Docetaxel.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando peptídico específico para Nectina-4 que comprende un polipéptido que comprende al menos tres restos de cisteína, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un armazón molecular que forma enlaces covalentes con los restos de cisteína del polipéptido de tal manera que se formen al menos dos bucles de polipéptido en el armazón molecular, en donde el ligando peptídico comprende la secuencia de aminoácidos:
 $C_iP[1NaI][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; en donde 1NaI representa 1-naftilalanina, HArg representa homoarginina, HyP representa hidroxiprolina y C_i , C_{ii} y C_{iii} representan primer, segundo y tercer restos de cisteína, respectivamente.
2. El ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8234);
Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122);
Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126);
(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8116);
Fluoresceína-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8205); y
[PYA][B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8846) tal como:
[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8234);
Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122);
Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126);
(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8116); y
Fluoresceína-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8205).
3. El ligando peptídico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122);
Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126); y
(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8116).
4. El ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8122); y
Ac-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8126).
5. El ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (en lo sucesivo en el presente documento denominada BCY8234).
6. El ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el armazón molecular se selecciona de 1',1''-(1,3,5-triazinano-1,3,5-triil)triprop-2-en-1-ona (TATA).
7. El ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del ácido libre o la sal sódica, potásica, cálcica, de amonio.
8. El ligando peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la Nectina-4 es Nectina-4 humana.
9. Un conjugado de fármaco que comprende un ligando peptídico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, conjugados con uno o más grupos efectores y/o funcionales, tal como uno o más agentes citotóxicos, en particular MMAE o DM1, más particularmente MMAE.
10. El conjugado de fármaco como se define en la reivindicación 9, en donde el agente citotóxico es MMAE y dicho conjugado comprende adicionalmente un enlazador seleccionado de: -PABC-Cit-Val-Glutaril- o -PABC-ciclobutil-Ala-Cit-βAla-, tal como -PABC-Cit-Val-Glutaril-, en donde PABC representa *p-aminobencilcarbamato*.
11. El conjugado de fármaco como se define en la reivindicación 9, en donde el agente citotóxico es DM1 y dicho conjugado comprende además un enlazador que es -SPDB-(SO₃H)-, en donde SPDB representa 3-(2-piridiliditio)propionato de N-succinimidilo.
12. El conjugado de fármaco como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que se selecciona de: BCY8245 o BCY8549, en particular BCY8245.

13. Un compuesto que es BCY8245 (BCY00008245) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde BCY8245 tiene la estructura:



5

en donde BCY00008234 (BYC8234) es un polipéptido de secuencia:

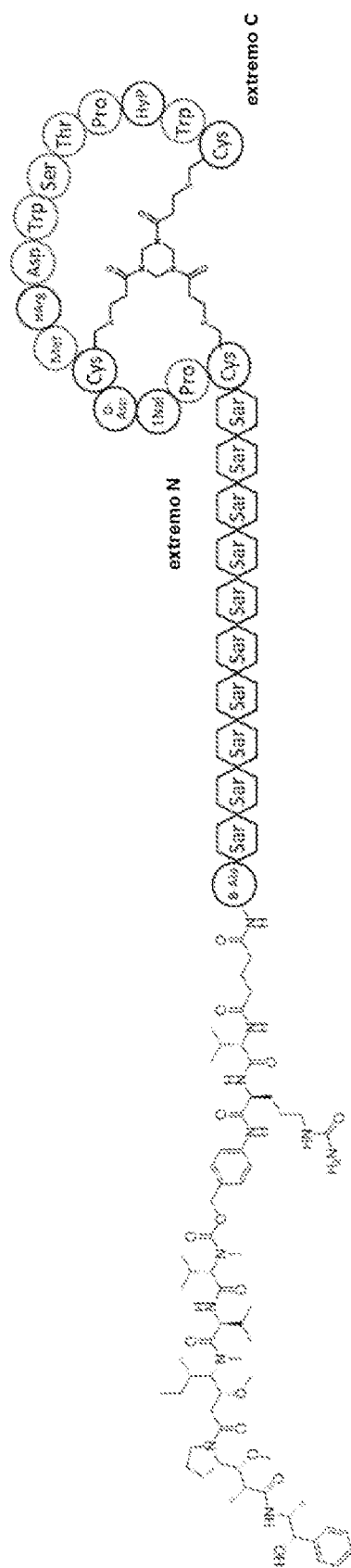
[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1)

en donde SEQ ID NO: 1 tiene la secuencia:

10 $C_iP[1NaI][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) en donde C_i , C_{ii} y C_{iii} representan primer, segundo y tercer restos de cisteína, respectivamente; y en donde el polipéptido de SEQ ID NO: 1 está ciclado en C_i , C_{ii} y C_{iii} con 1,1',1''-(1,3,5-triazinano-1,3,5-triil)triprop-2-en-1-ona (TATA).

14. El compuesto de la reivindicación 13 que es

15



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Un ligando peptídico, conjugado de fármaco o compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde SEQ ID NO: 1 está amidada en el extremo C.

5 16. Una composición farmacéutica que comprende el ligando peptídico, conjugado de fármaco o compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos.

10 17. El conjugado de fármaco, compuesto o composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, para su uso en la prevención, supresión o tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por Nectina-4, tal como cáncer.

15 18. El conjugado de fármaco, compuesto o composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, para su uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de cáncer en un paciente identificado que tiene una variación del número de copias (CNV) aumentada de Nectina-4.

20 19. El conjugado de fármaco, compuesto o composición farmacéutica para su uso como se define en la reivindicación 17 o 18, en donde dicho cáncer se selecciona de: mama, útero, vejiga, adenocarcinoma de pulmón, escamoso pulmonar, cervicouterino, cabeza y cuello, pancreático, tiroides, colorrectal, timoma, sarcoma, carcinoma de células renales (RCC), próstata y estómago.

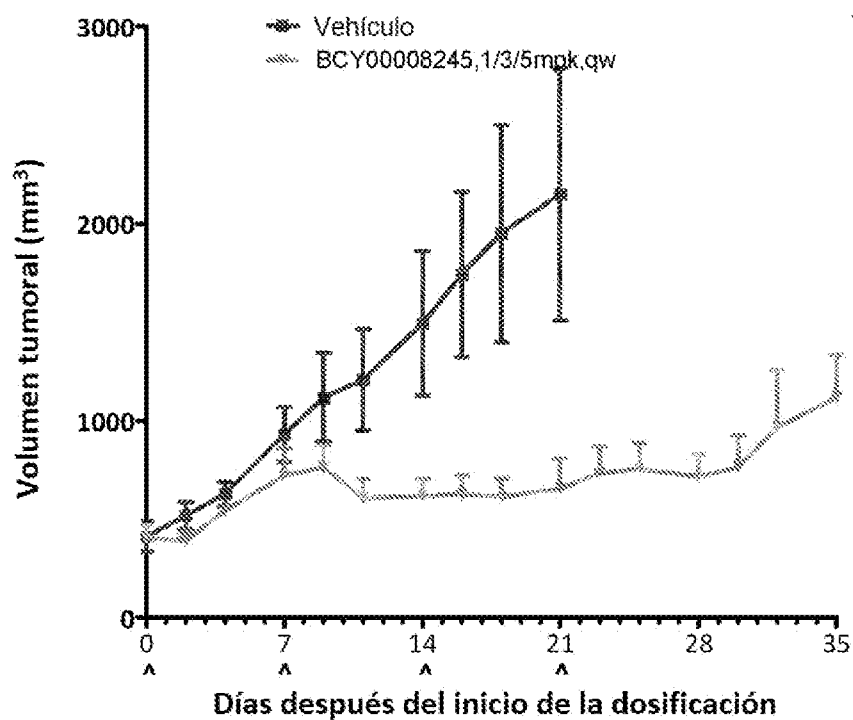


FIGURA 1

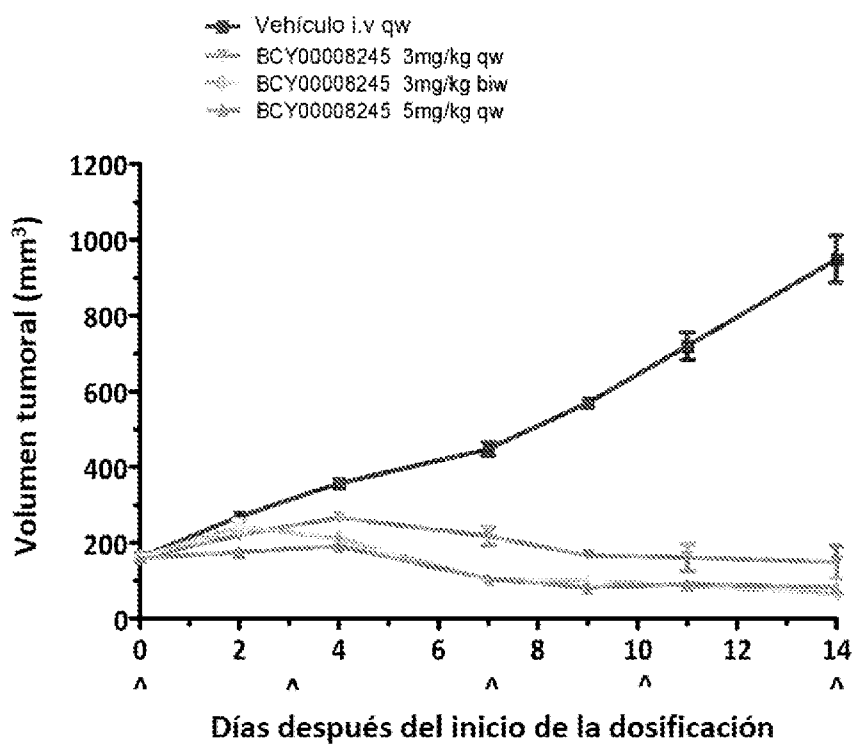


FIGURA 2

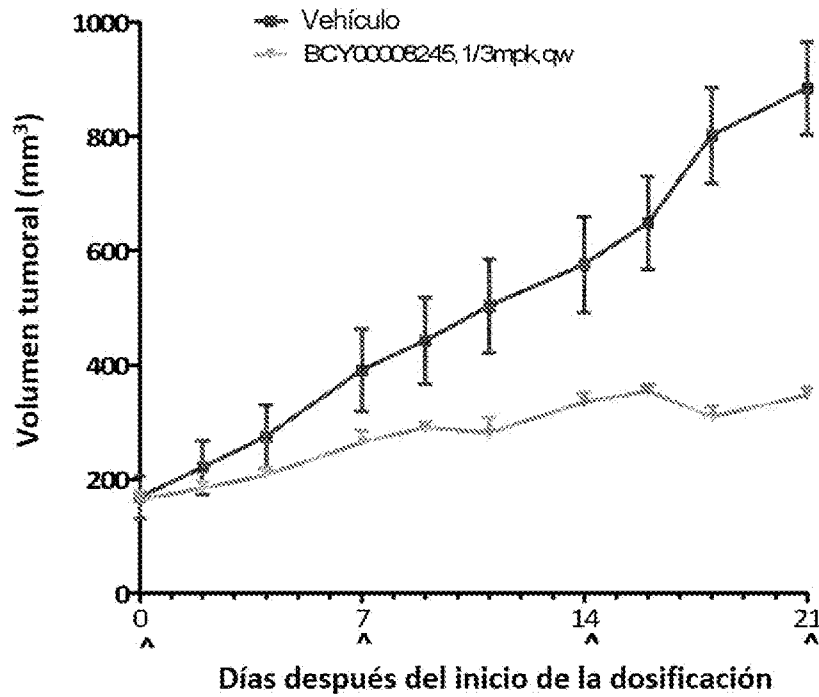


FIGURA 3

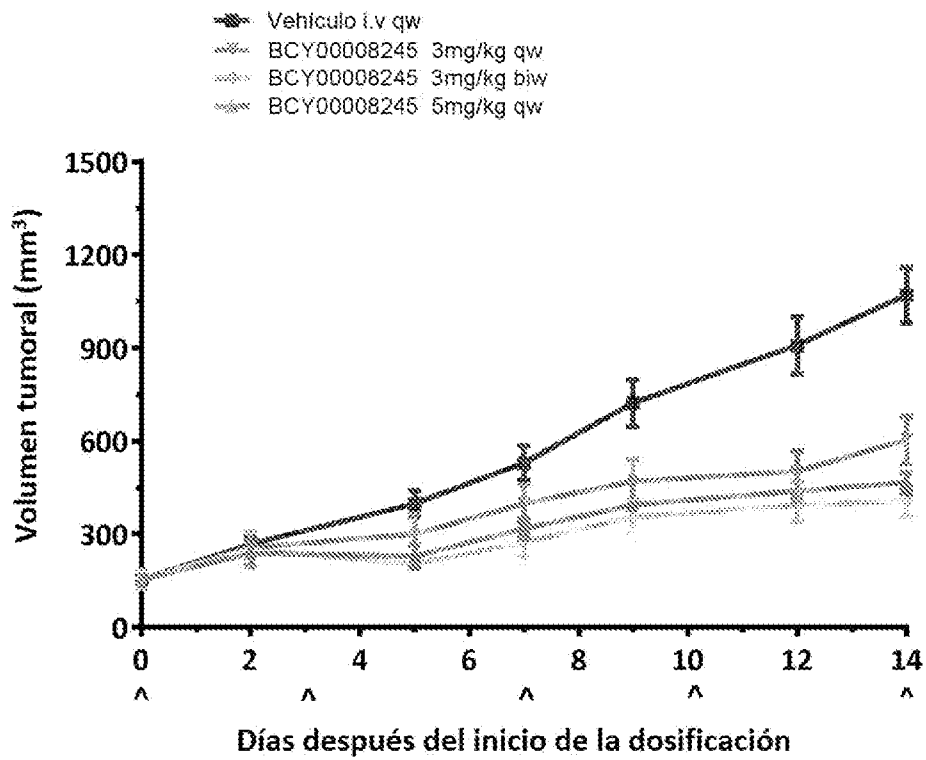


FIGURA 4

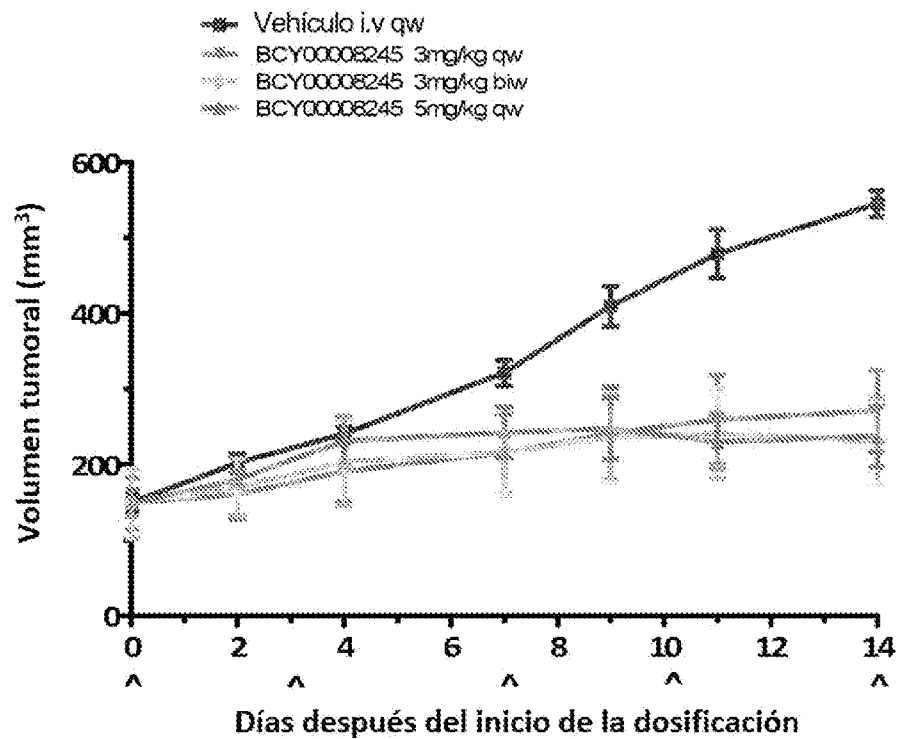


FIGURA 5

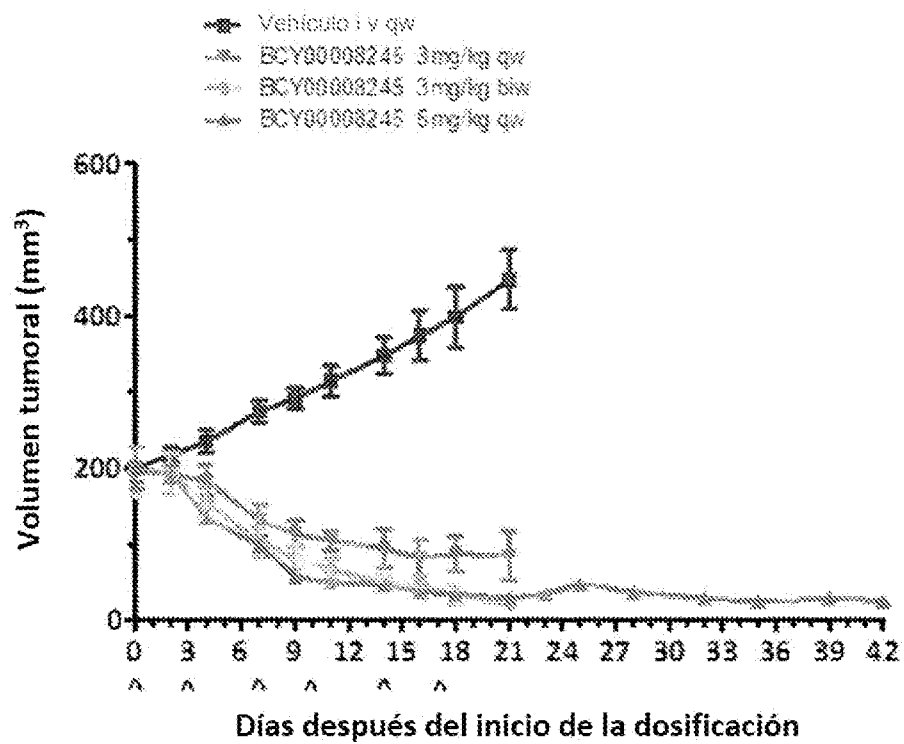


FIGURA 6

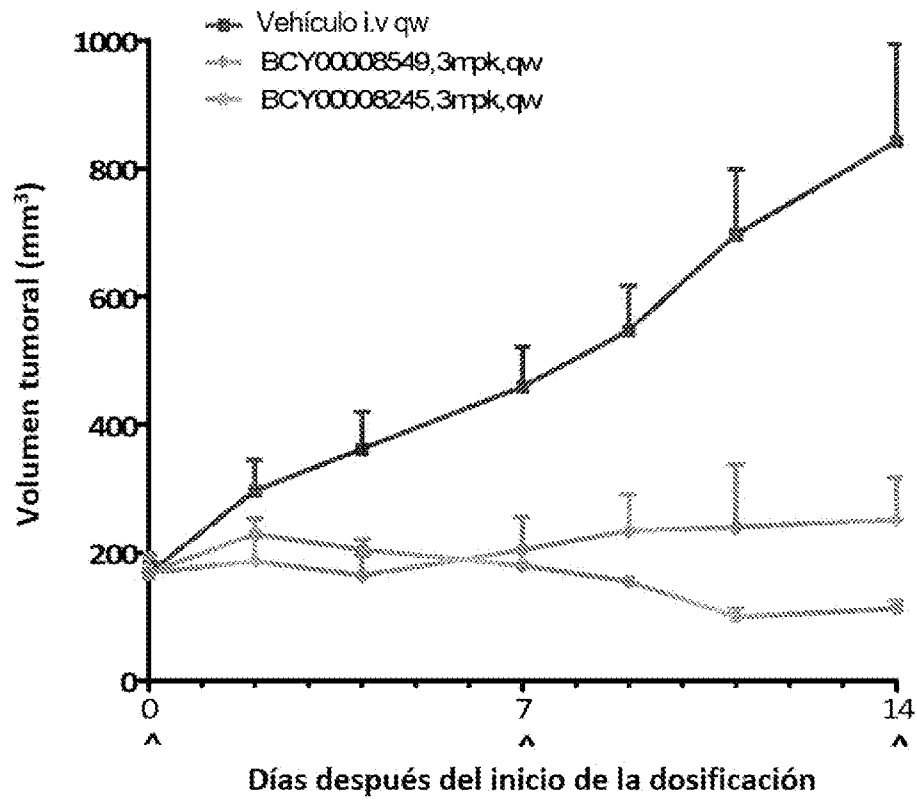


FIGURA 7

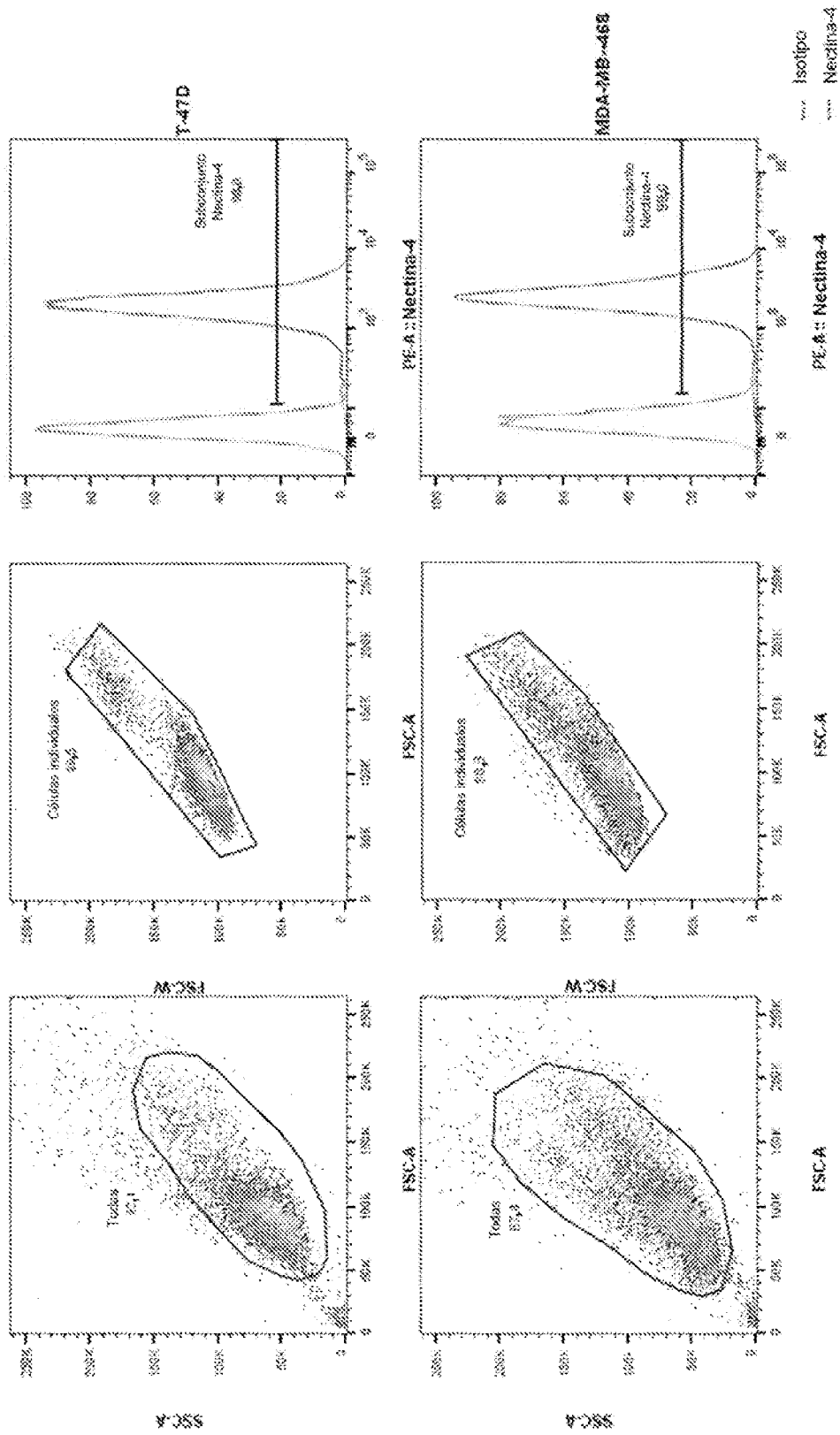


FIGURA 8

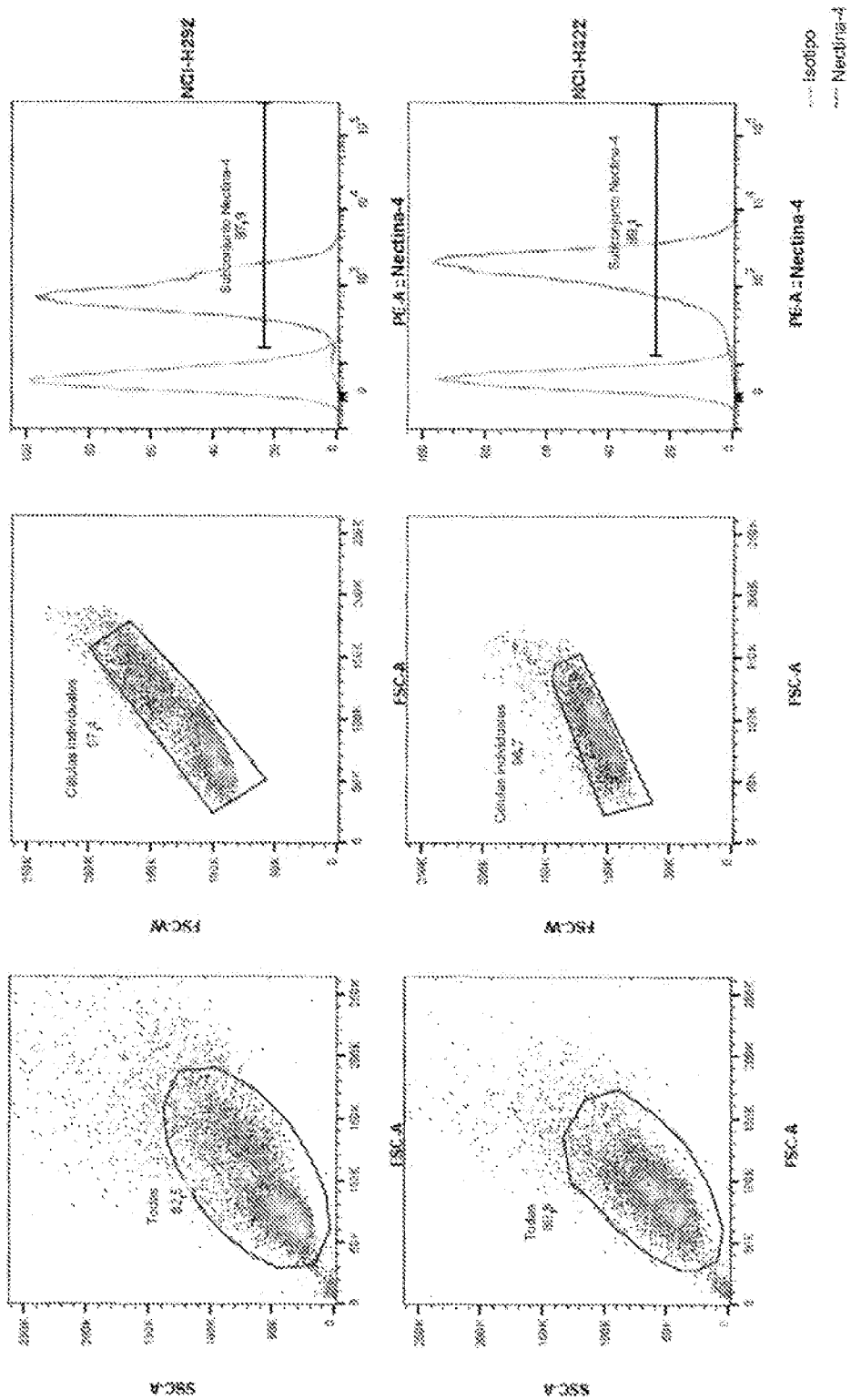


FIGURA 9

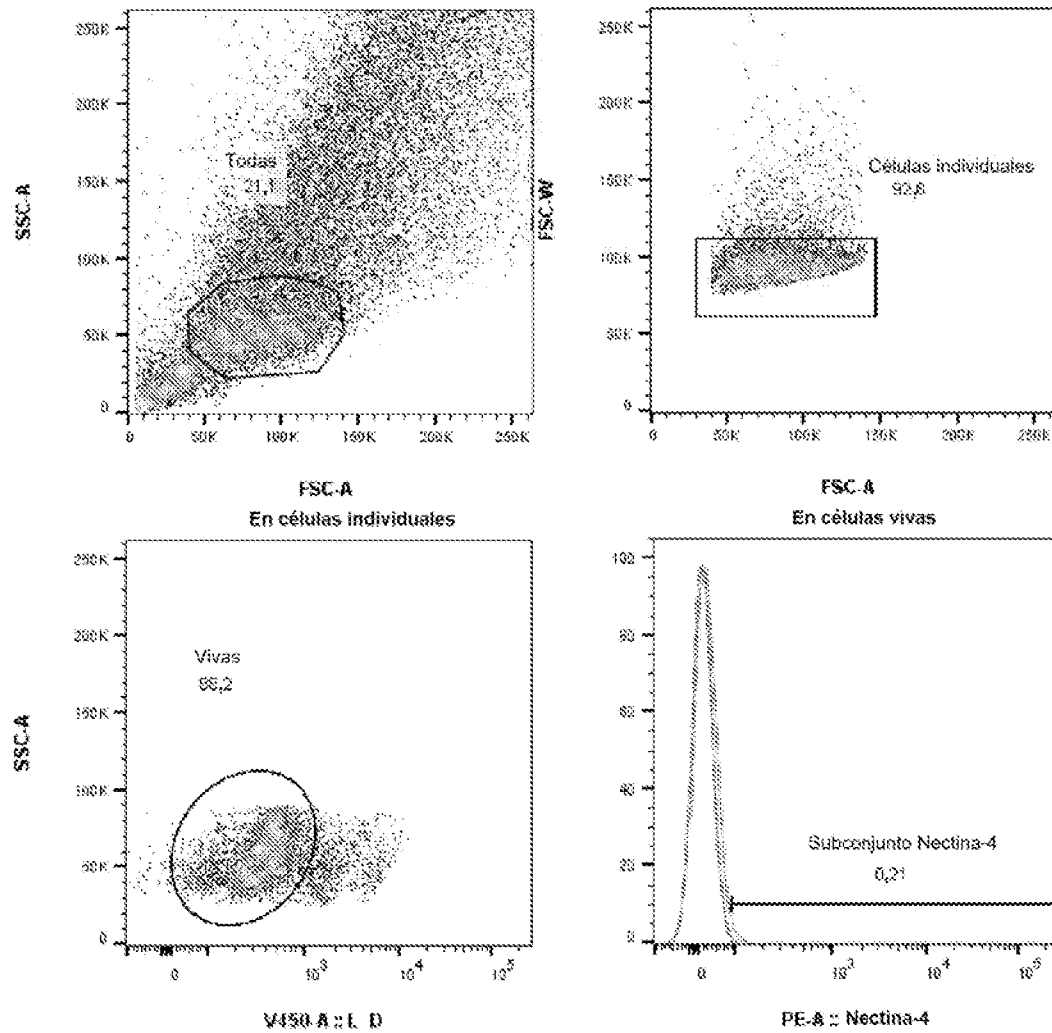


FIGURA 10

Isotipo
Nectina-4

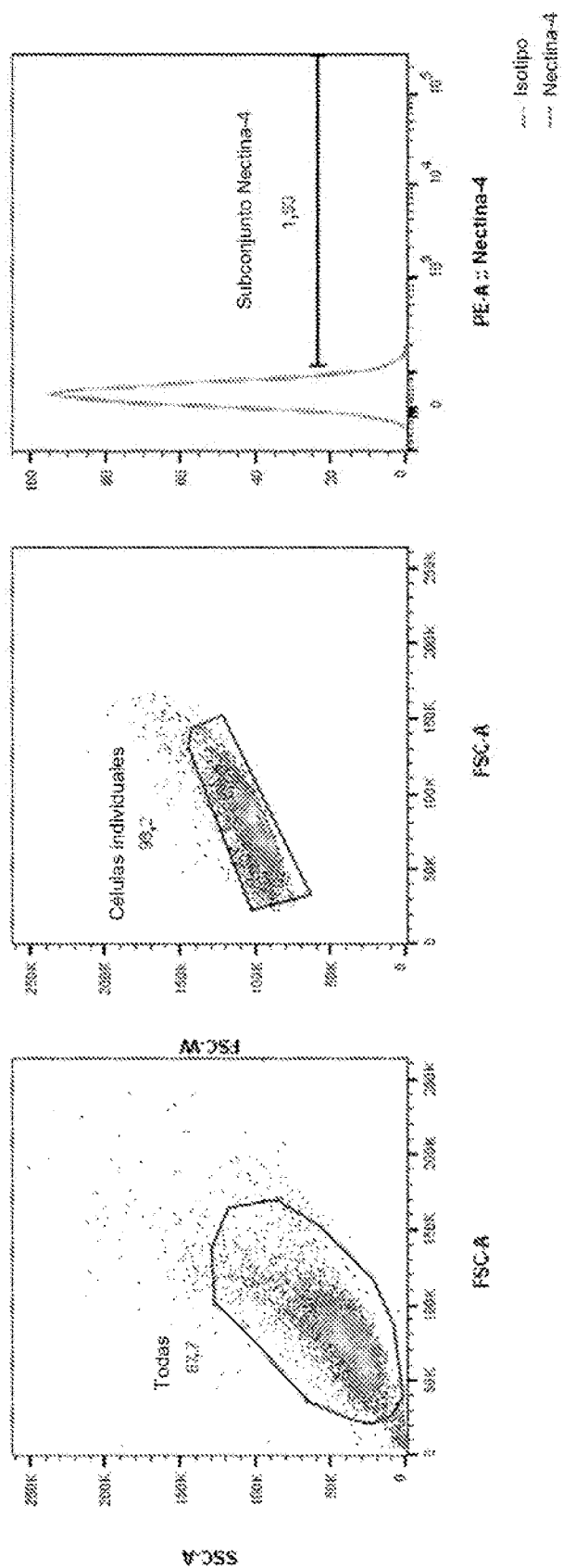


FIGURA 11

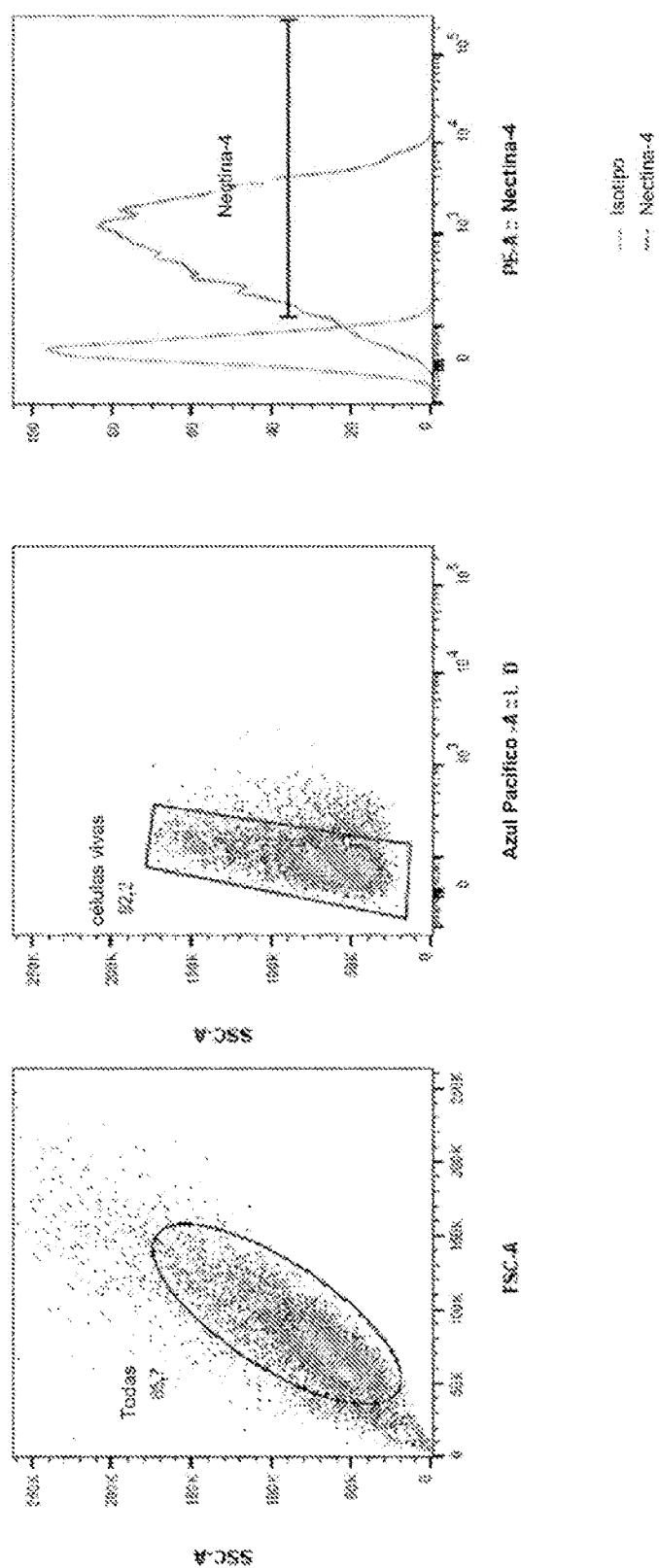


FIGURA 12

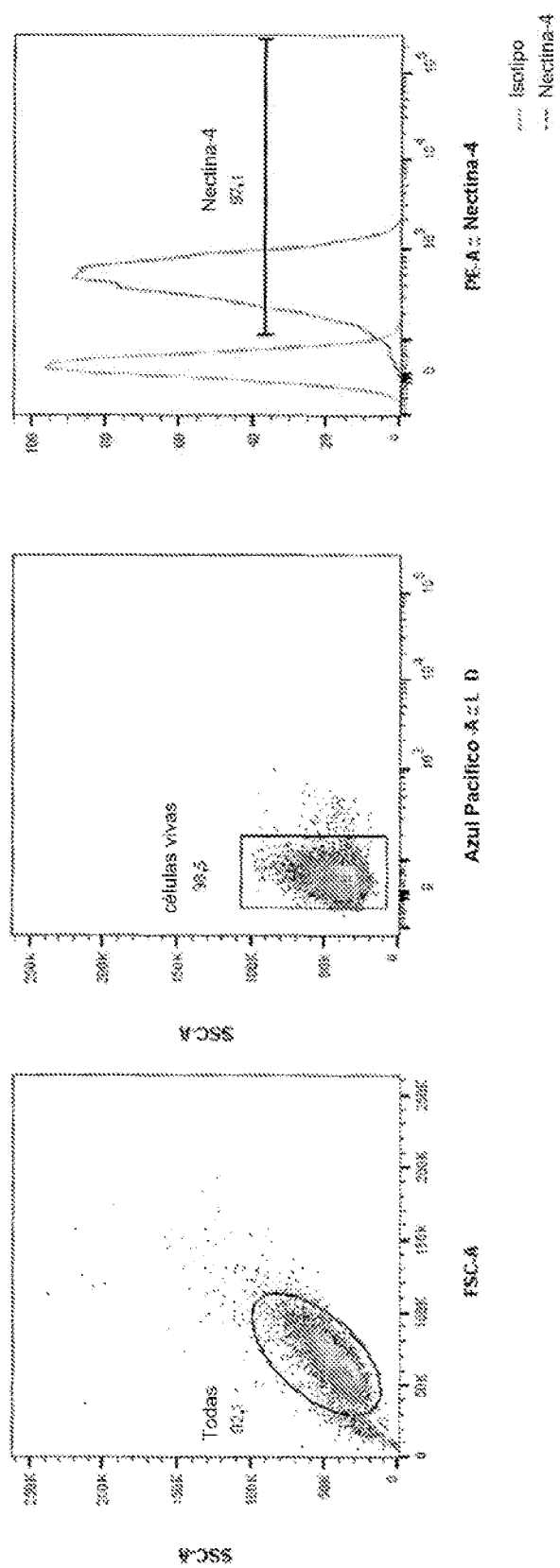


FIGURA 13

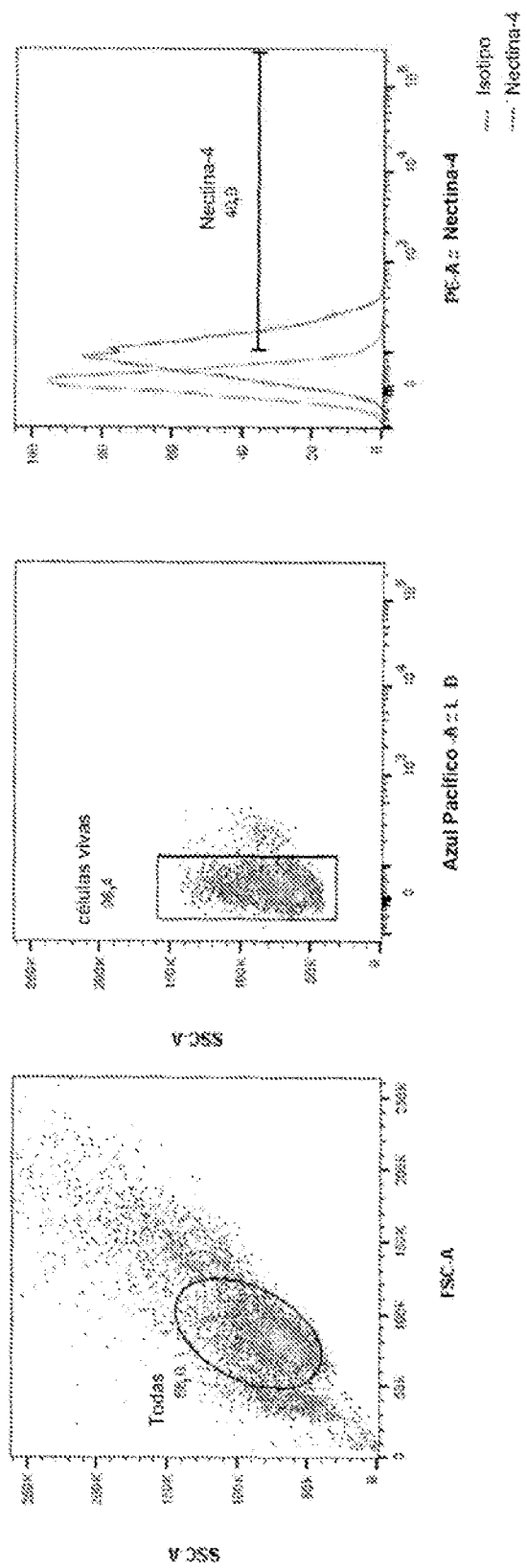
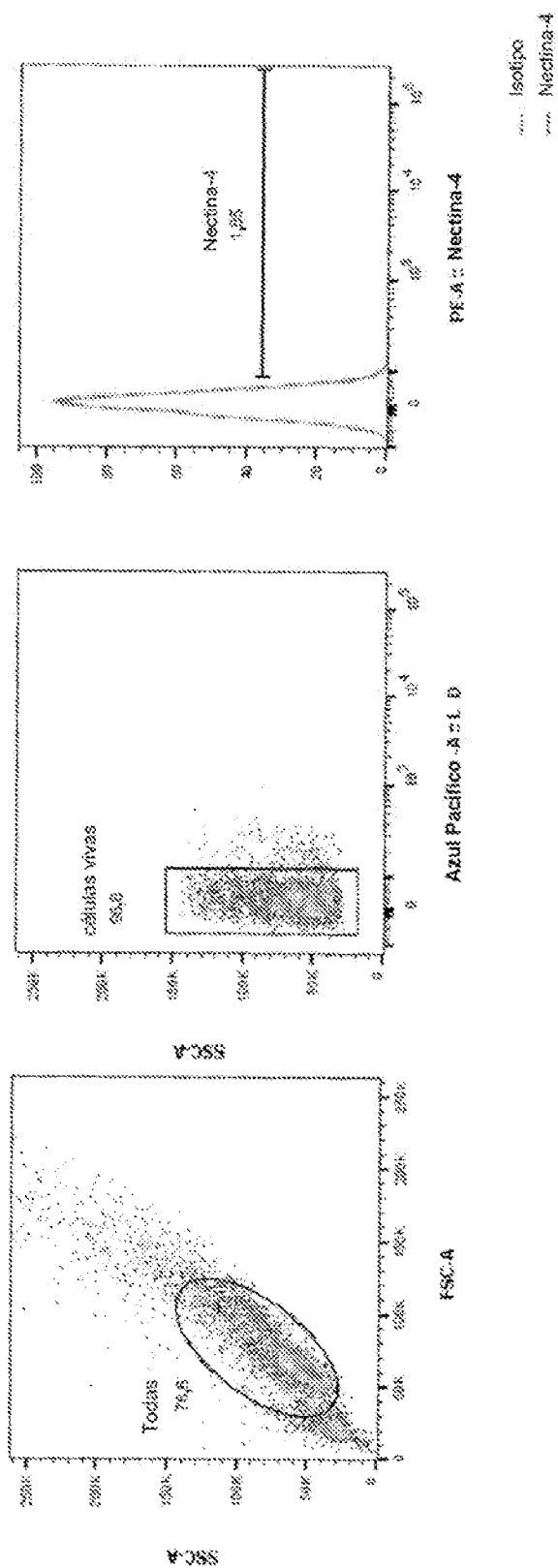


FIGURA 14A



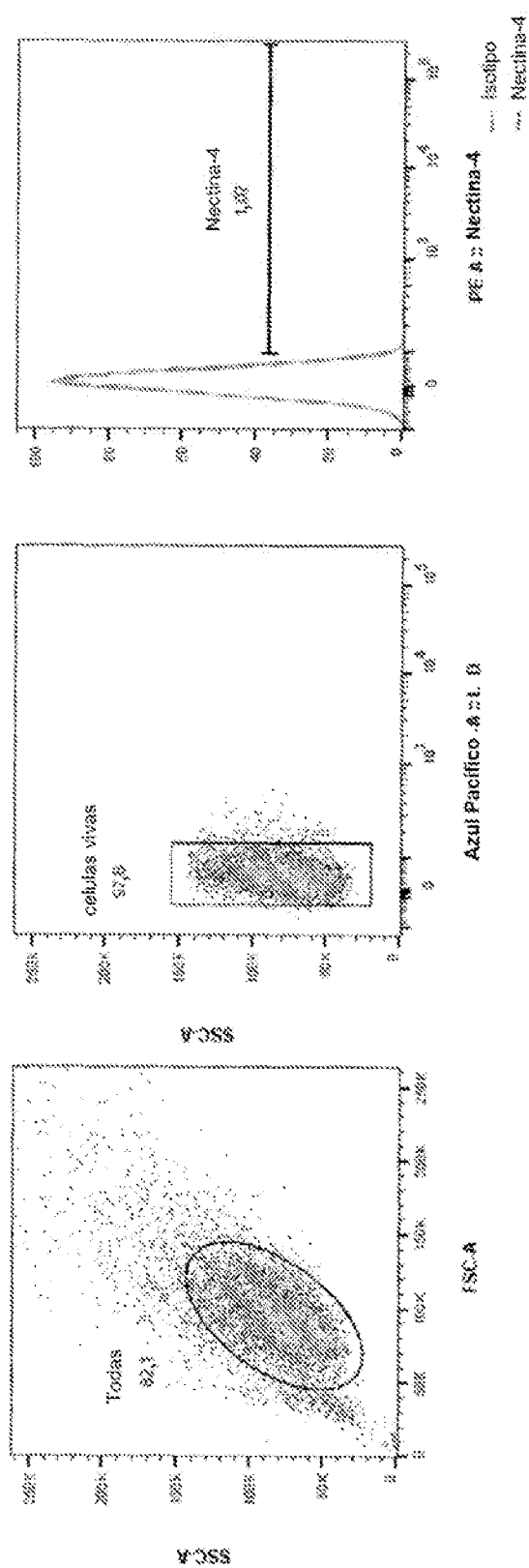


FIGURA 15A

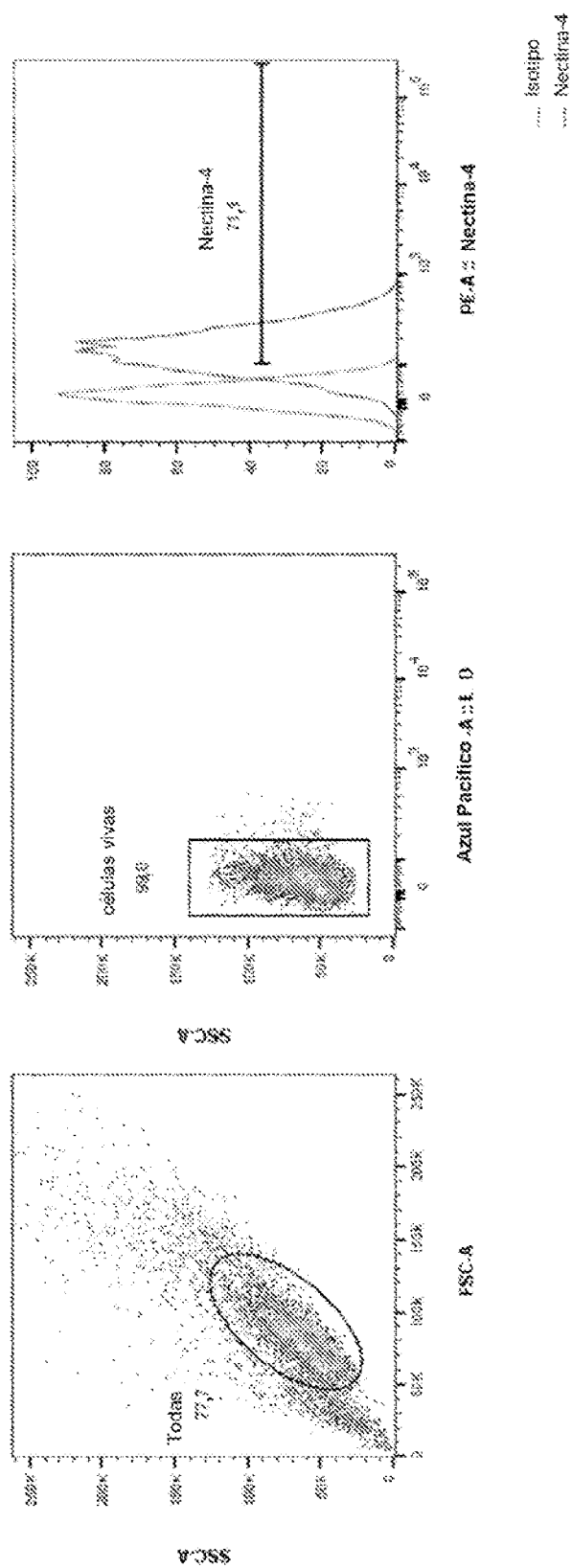


FIGURA 15B

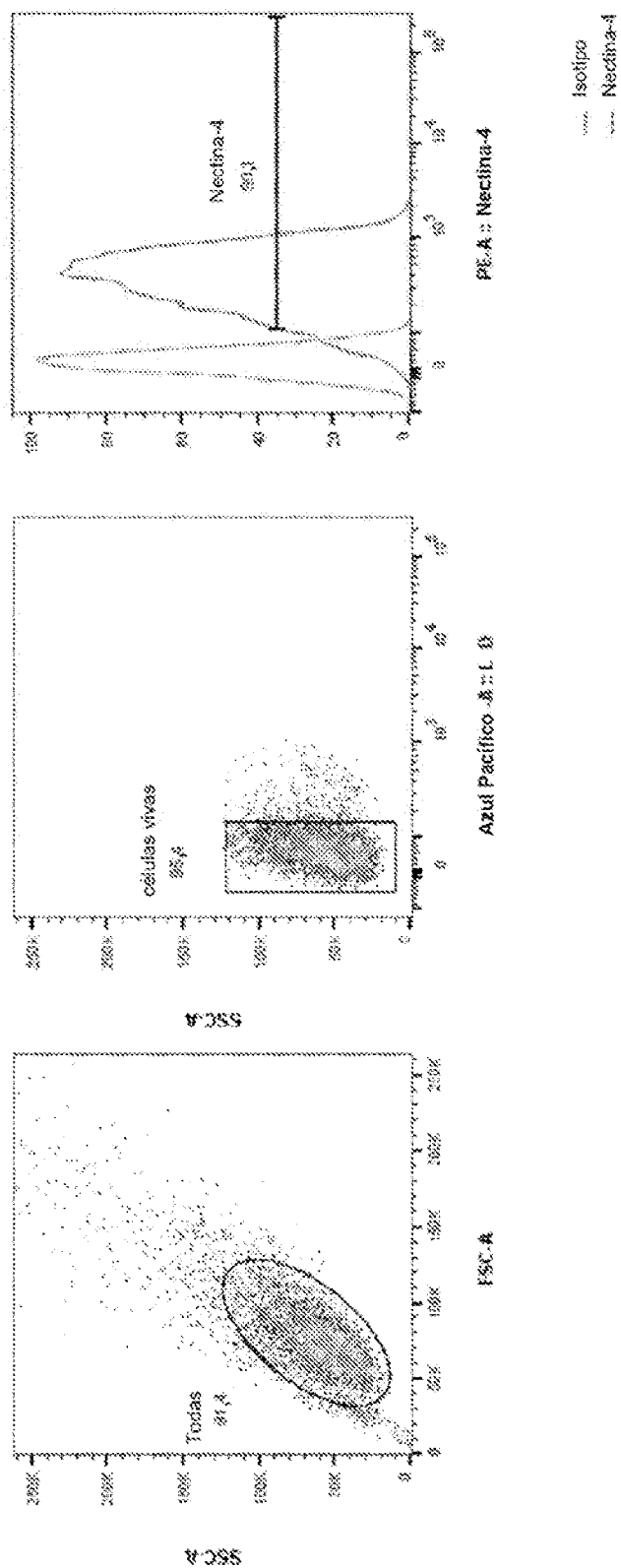


FIGURA 15C

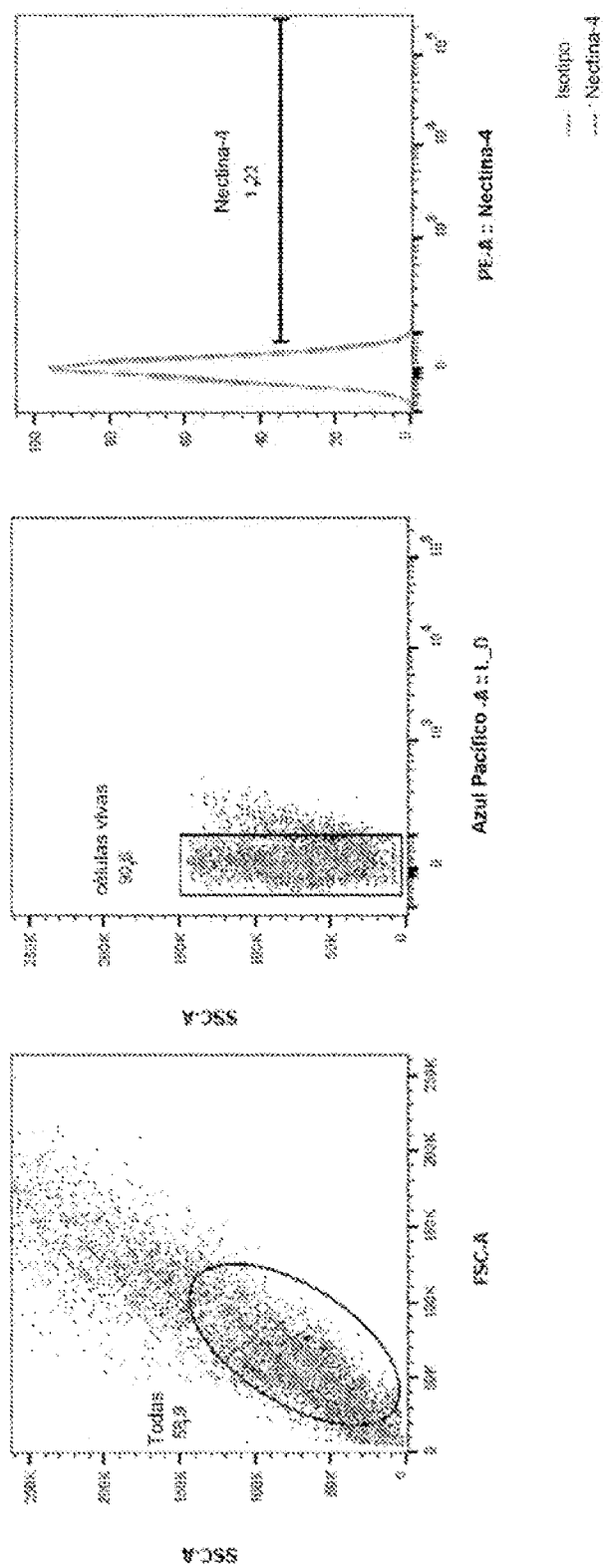


FIGURA 15D

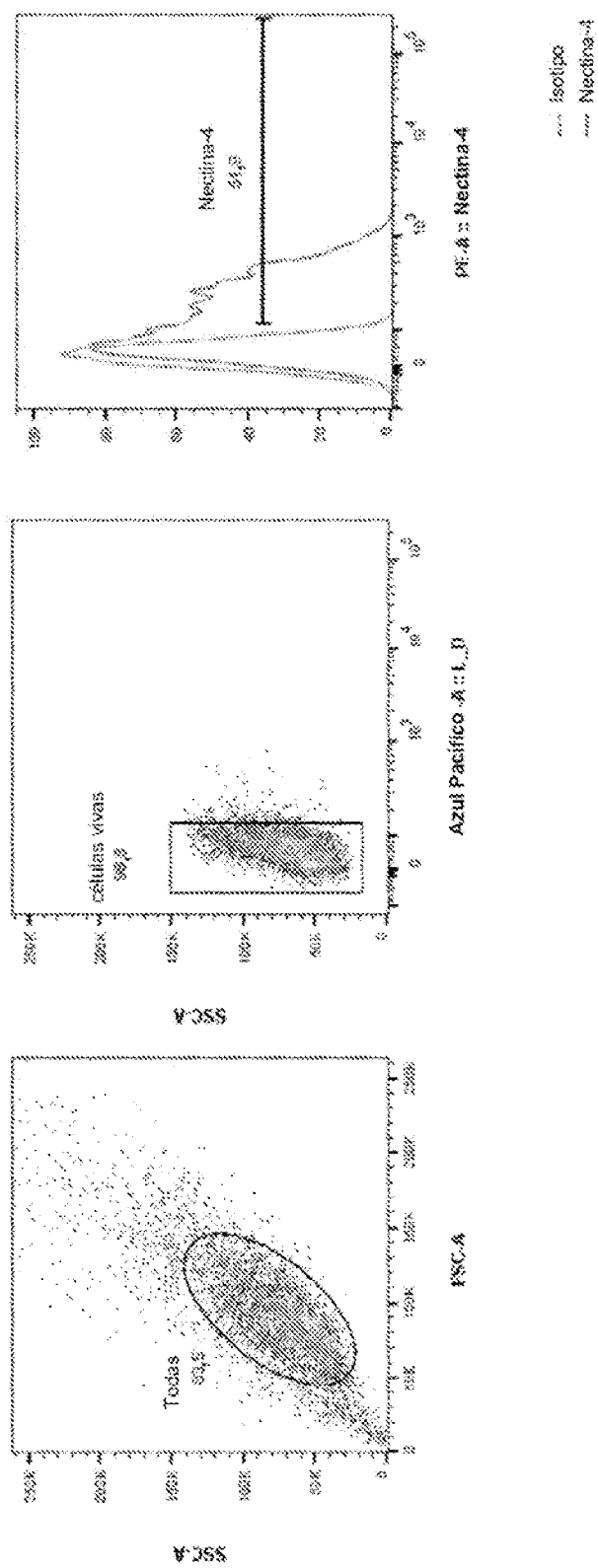


FIGURA 16

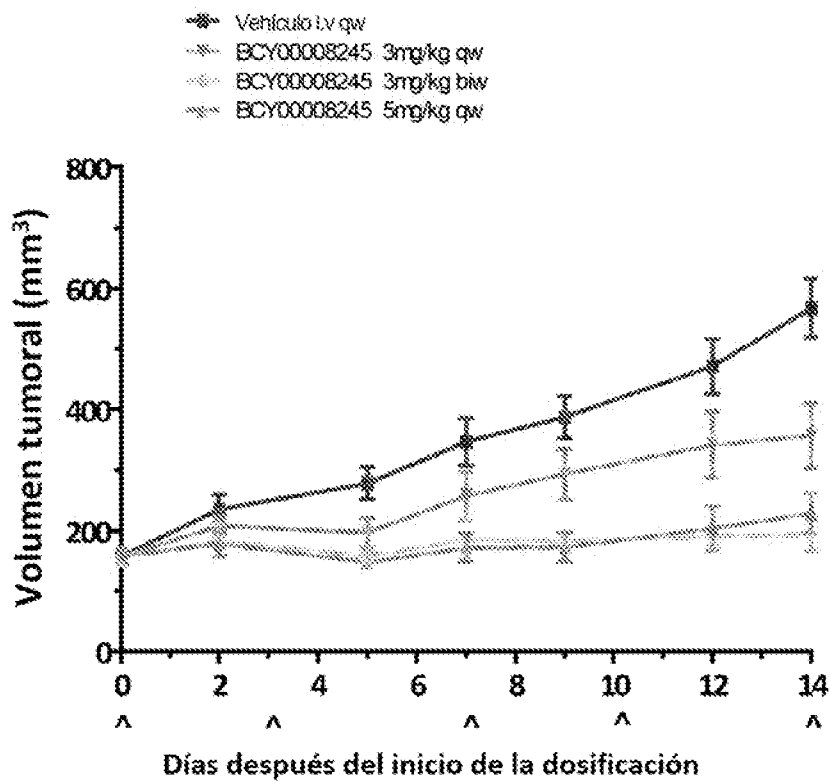


FIGURA 17

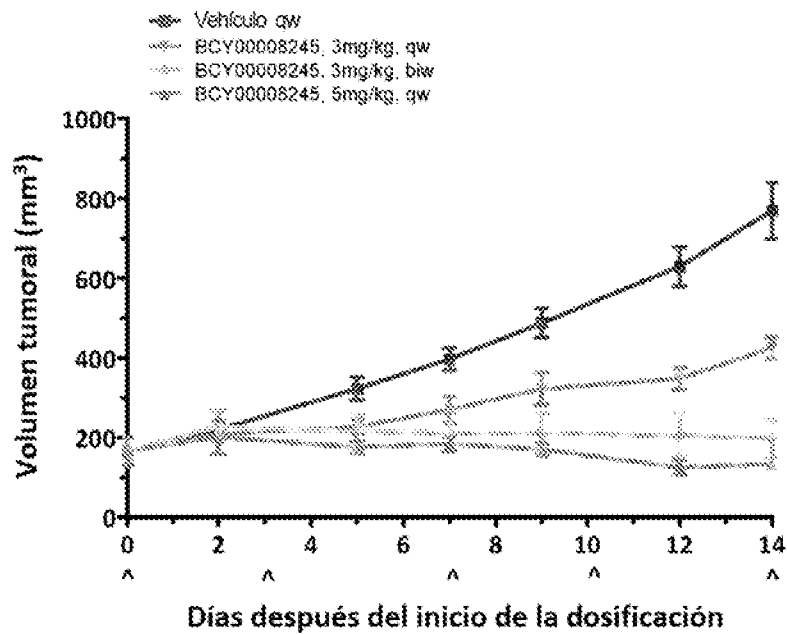


FIGURA 18

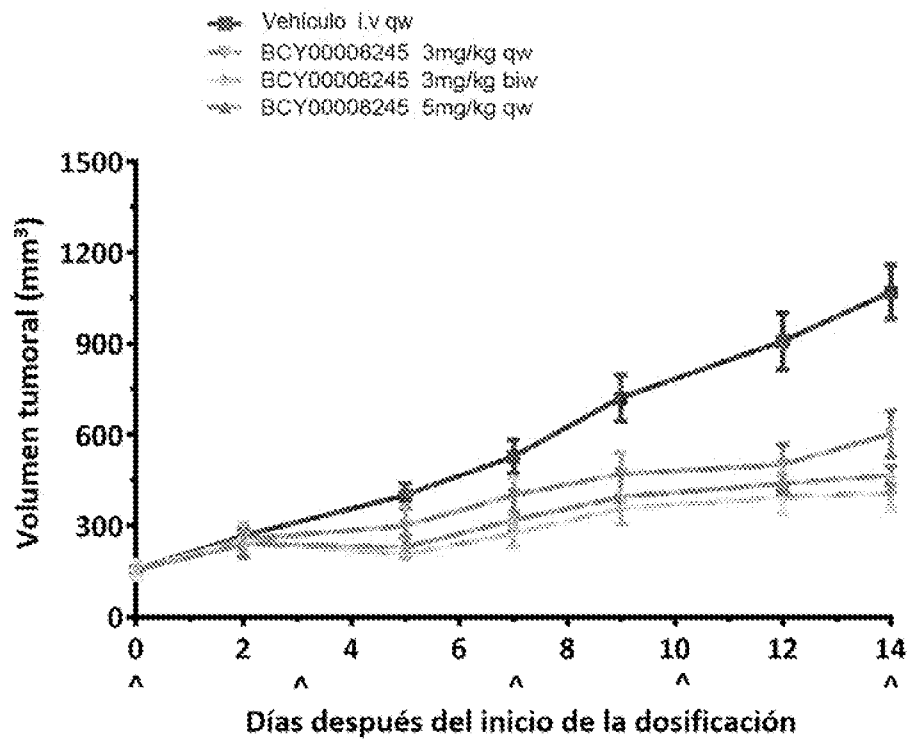


FIGURA 19

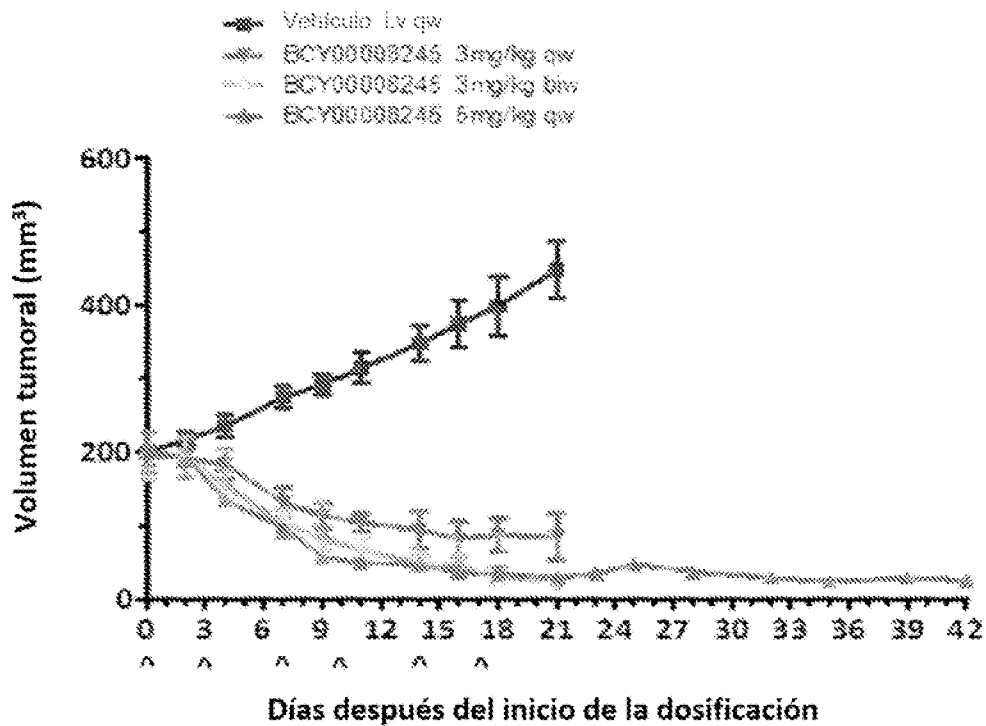


FIGURA 20

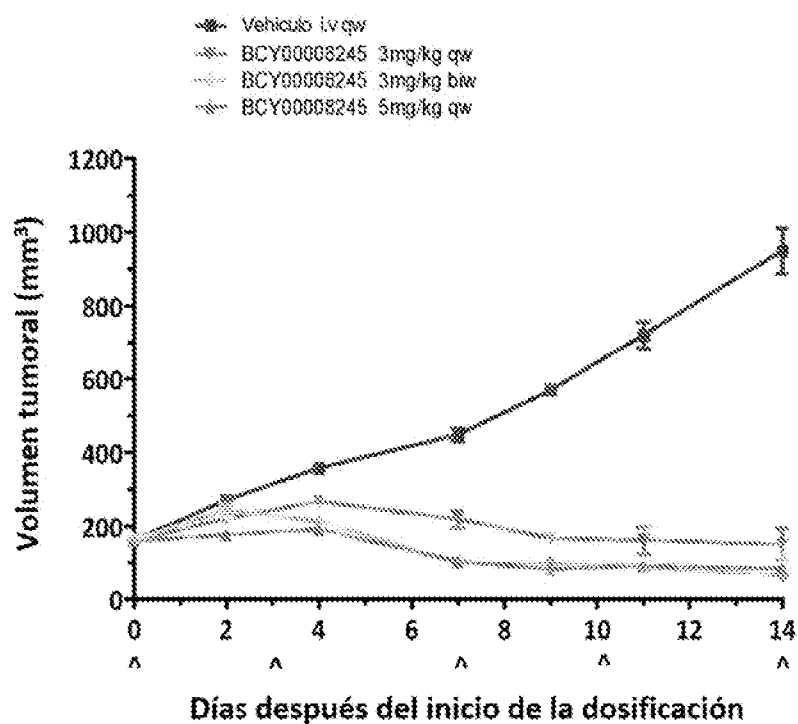


FIGURA 21

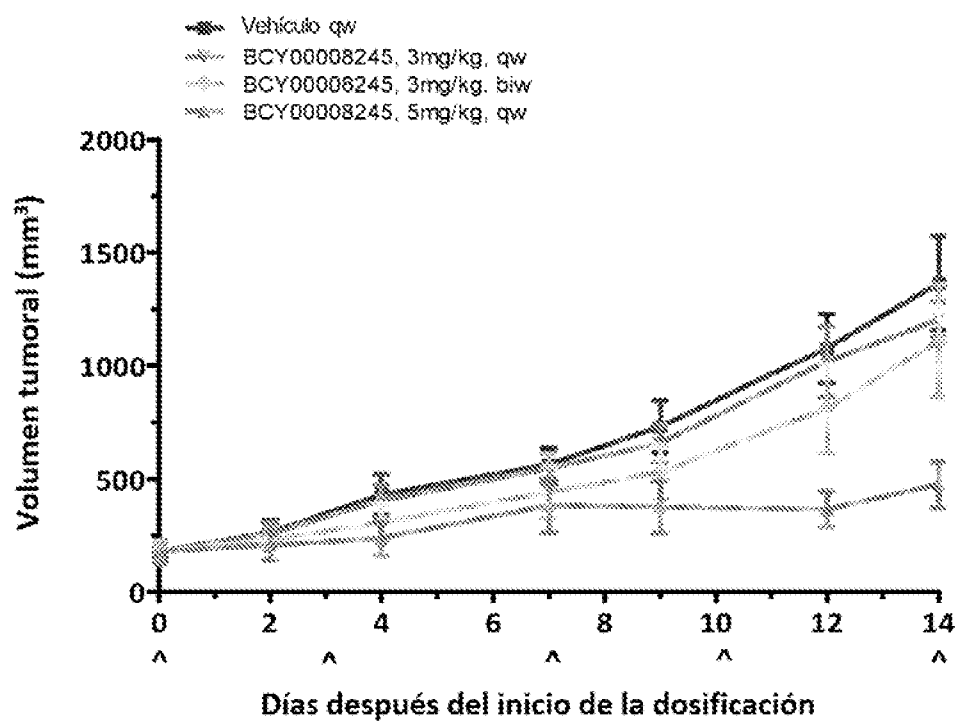


FIGURA 22

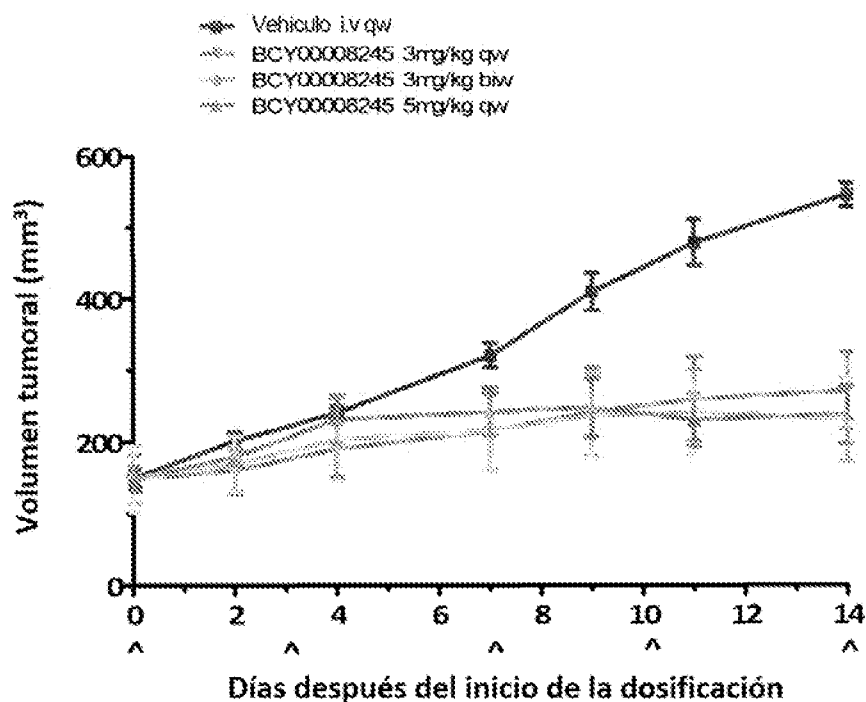


FIGURA 23

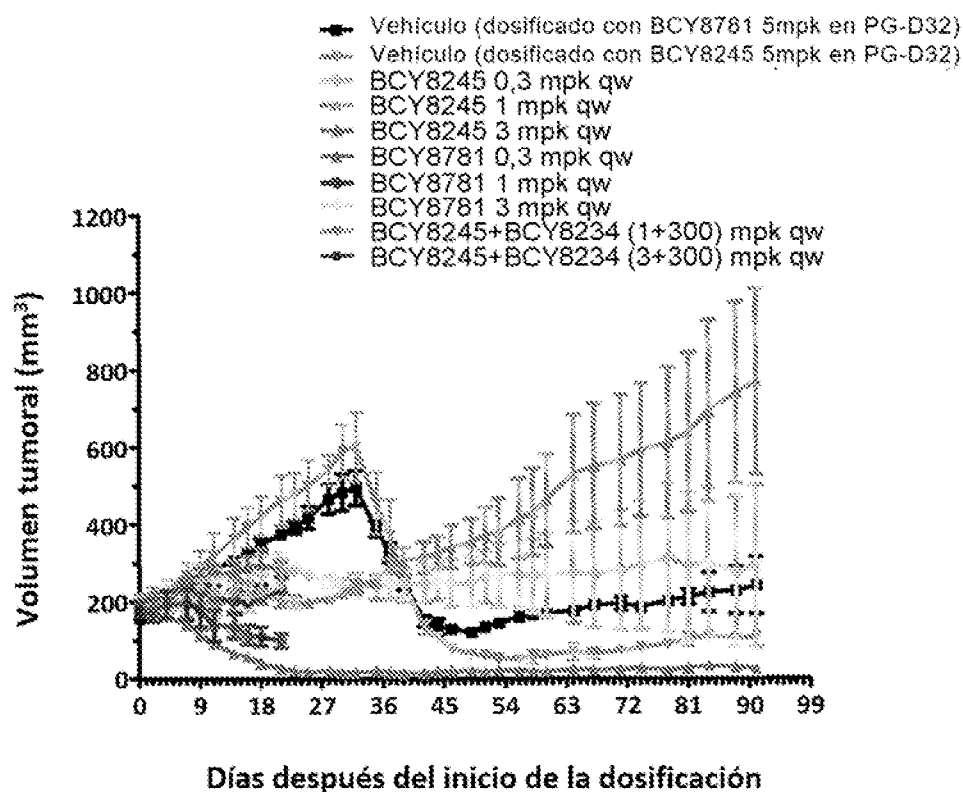


FIGURA 24

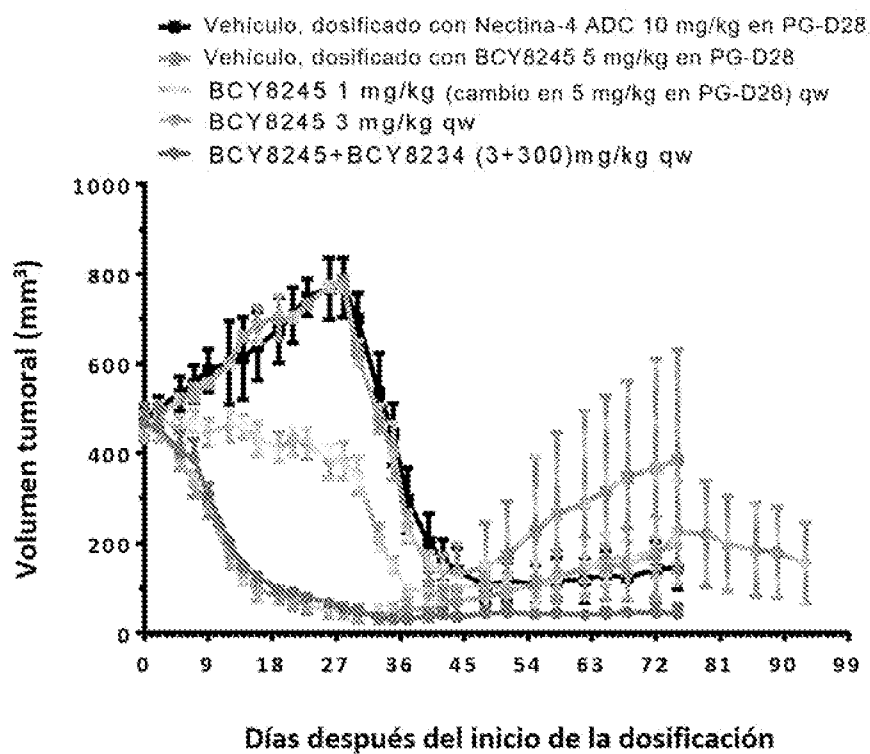


FIGURA 25

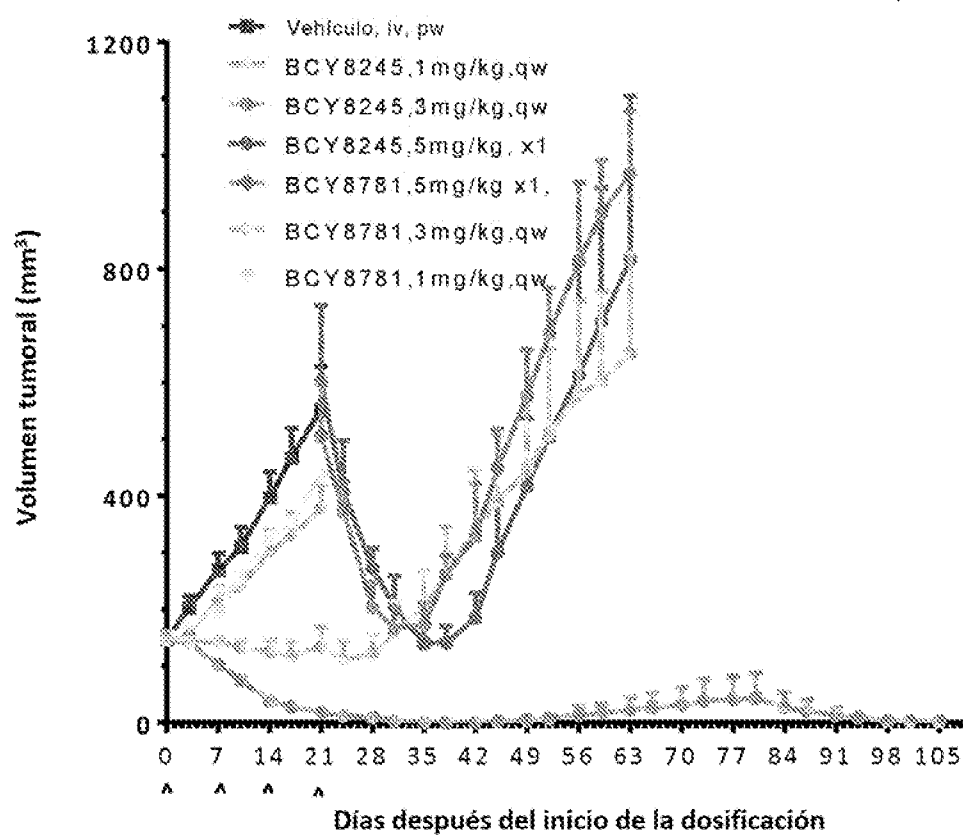


FIGURA 26

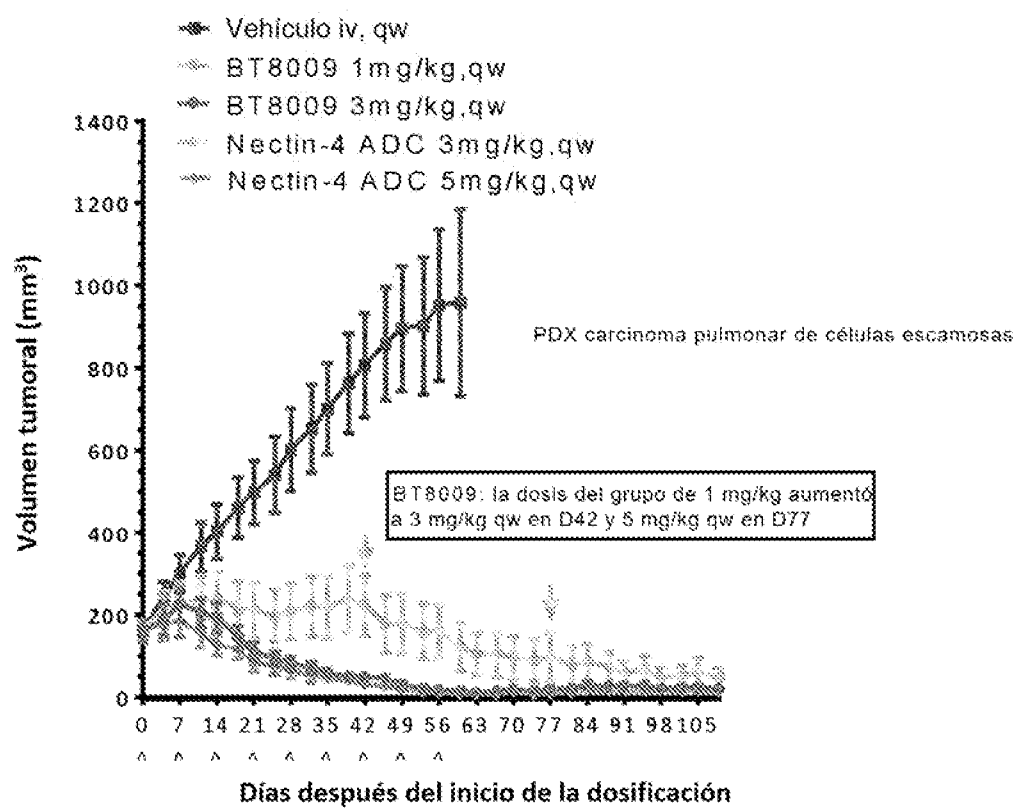
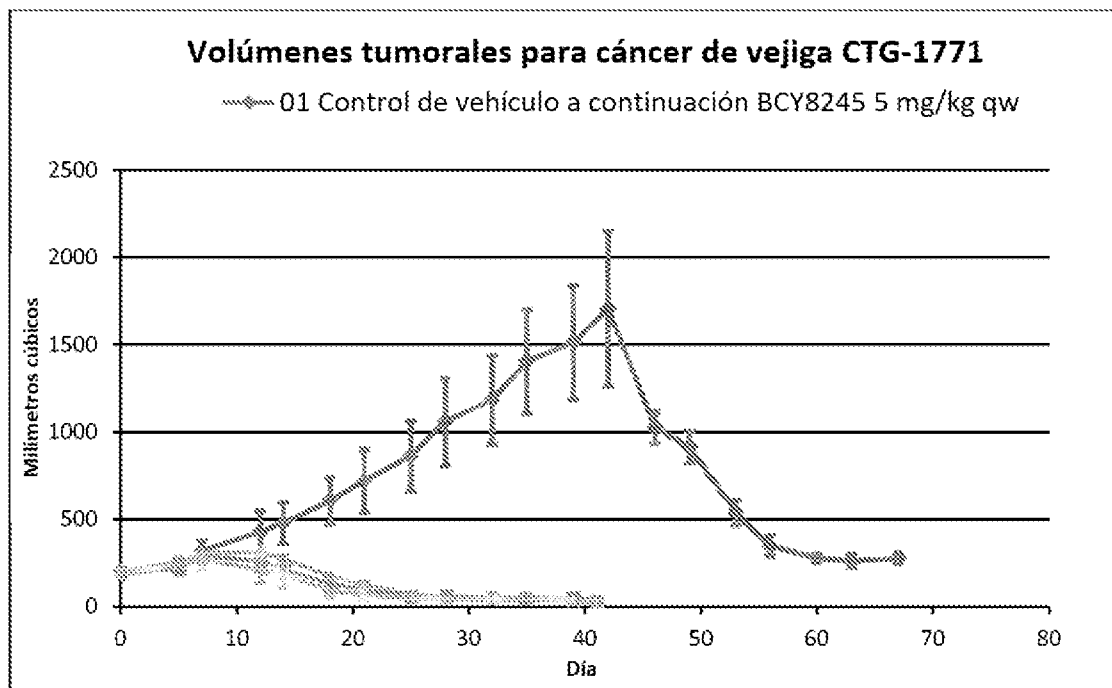
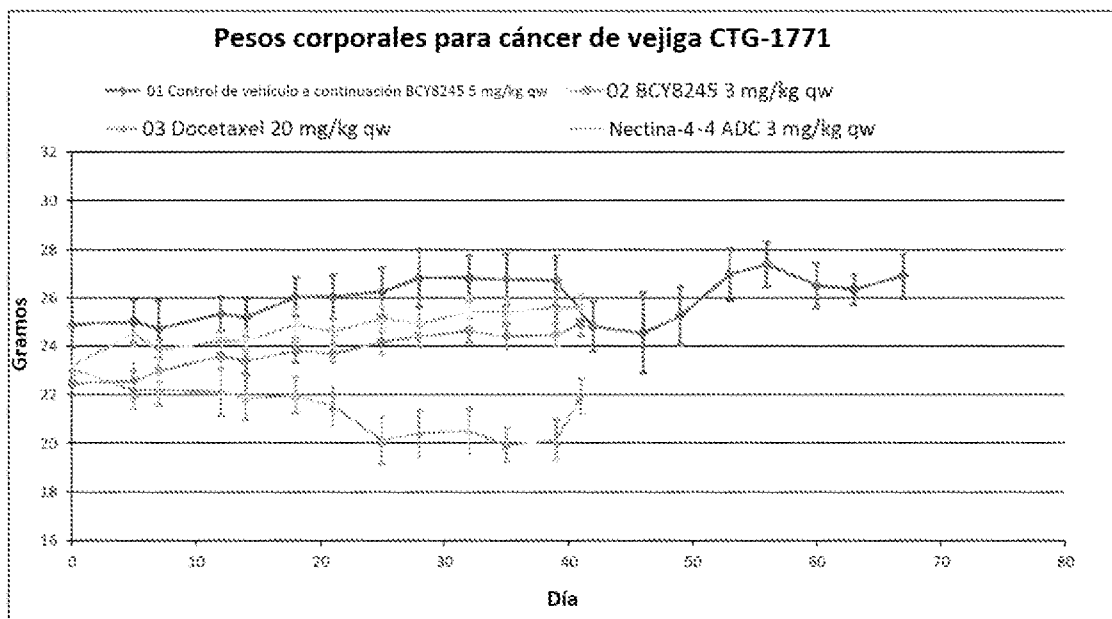


FIGURA 27

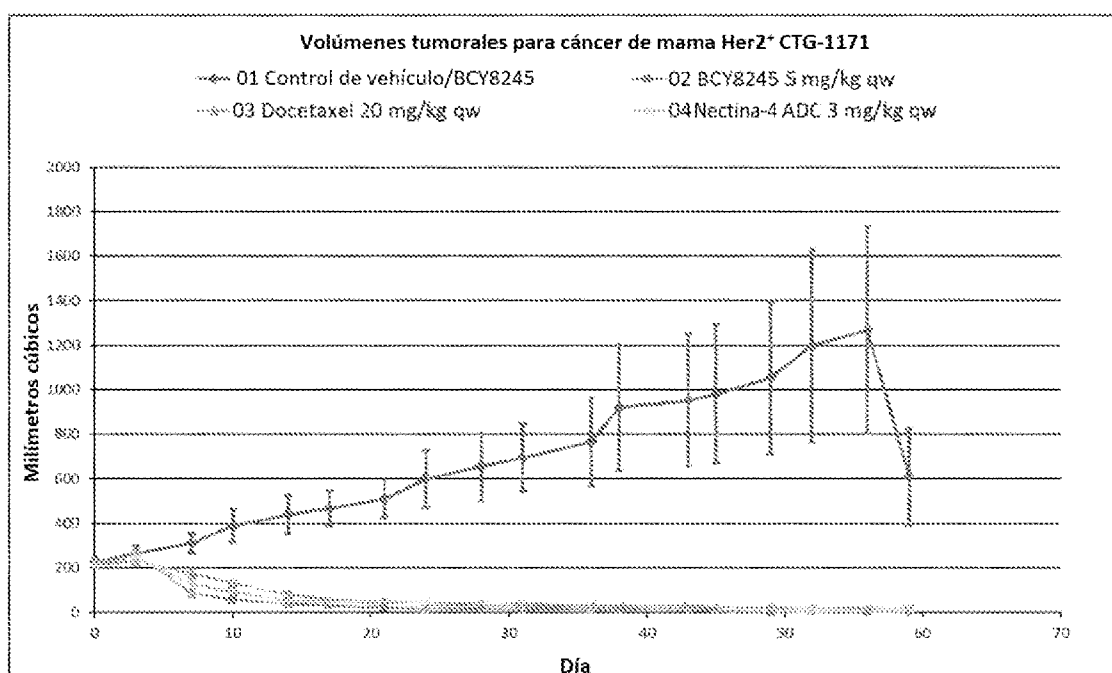


(A)

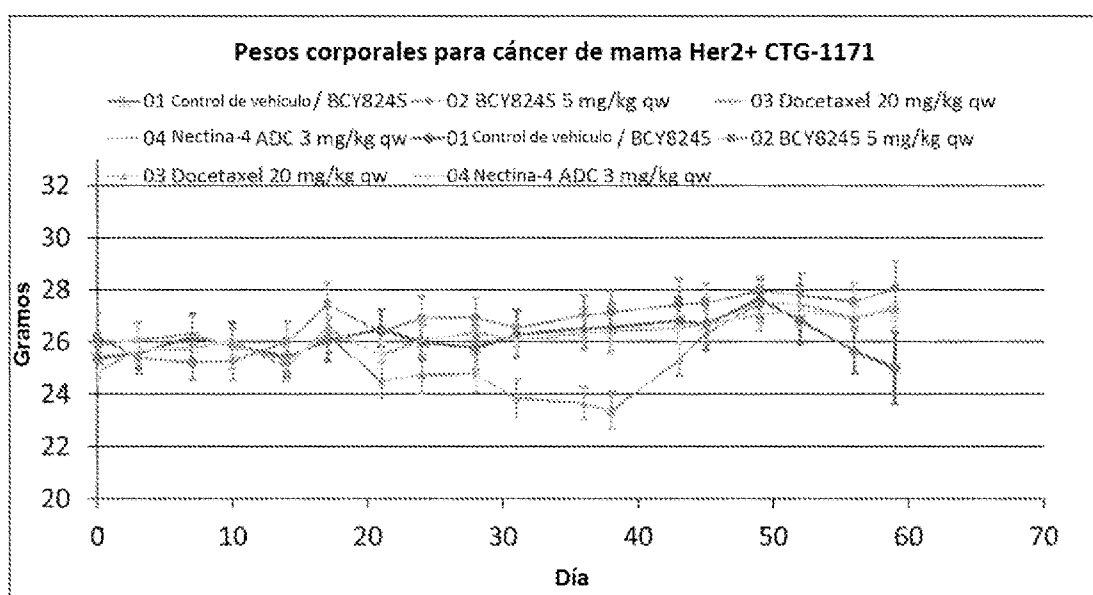


(B)

FIGURA 28

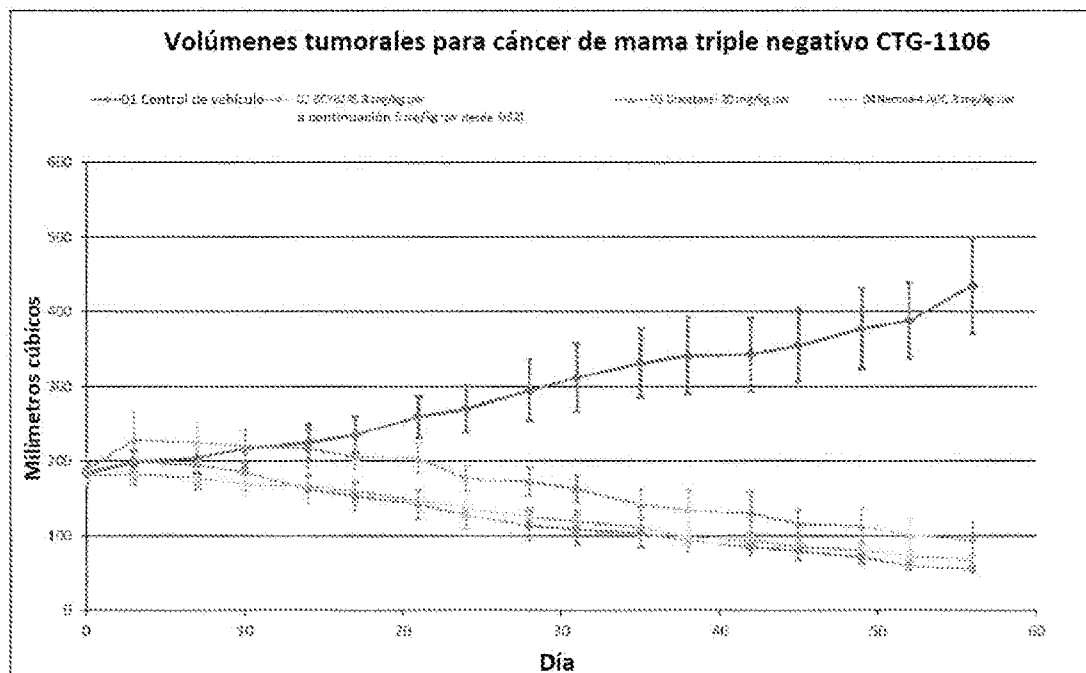


(A)

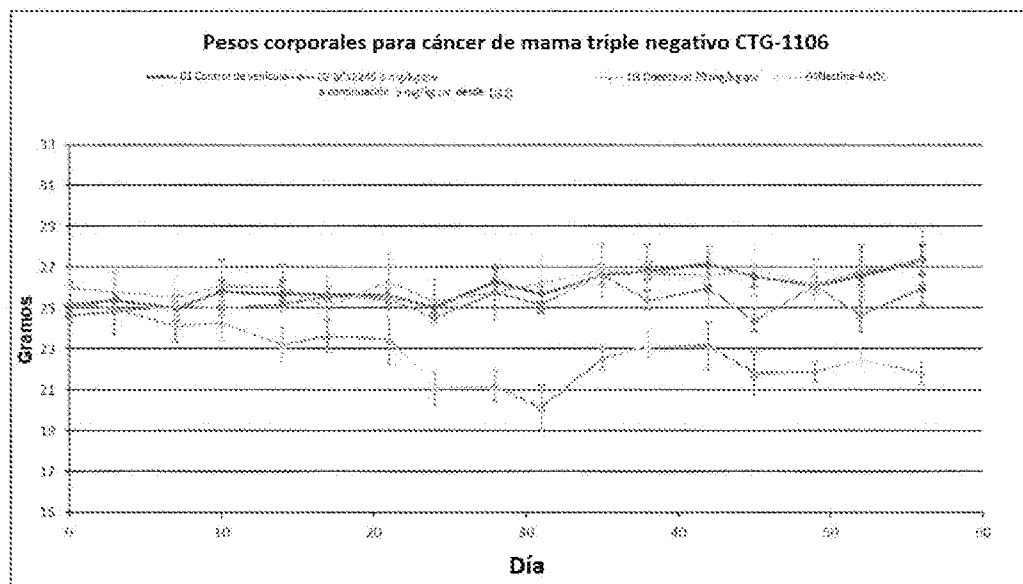


(B)

FIGURA 29

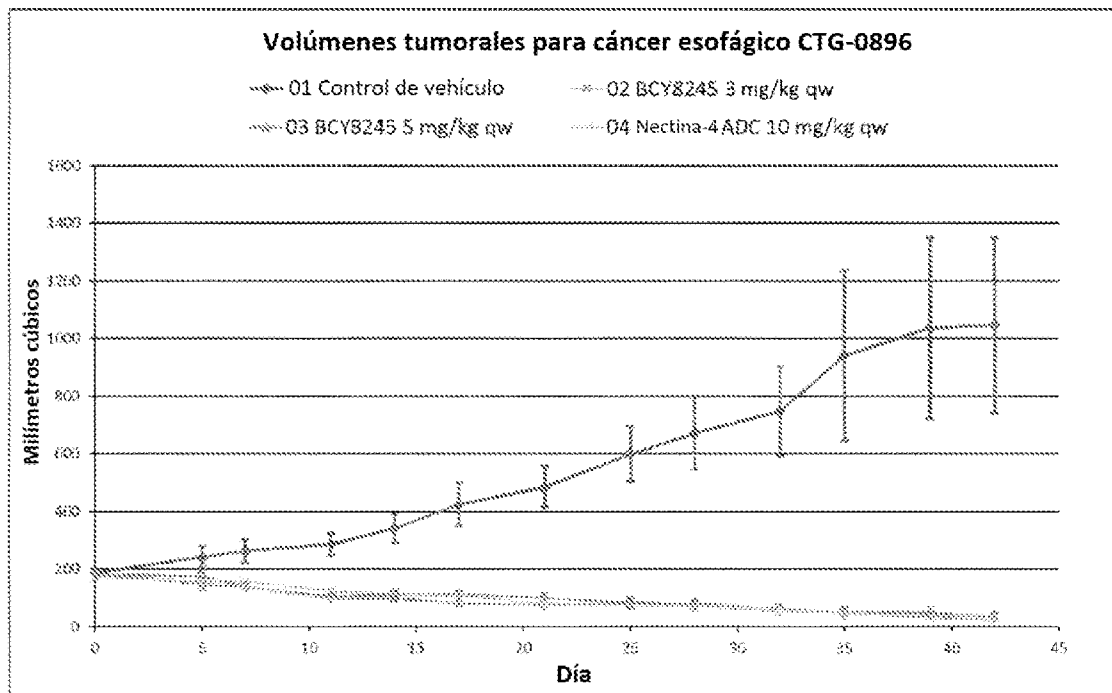


(A)

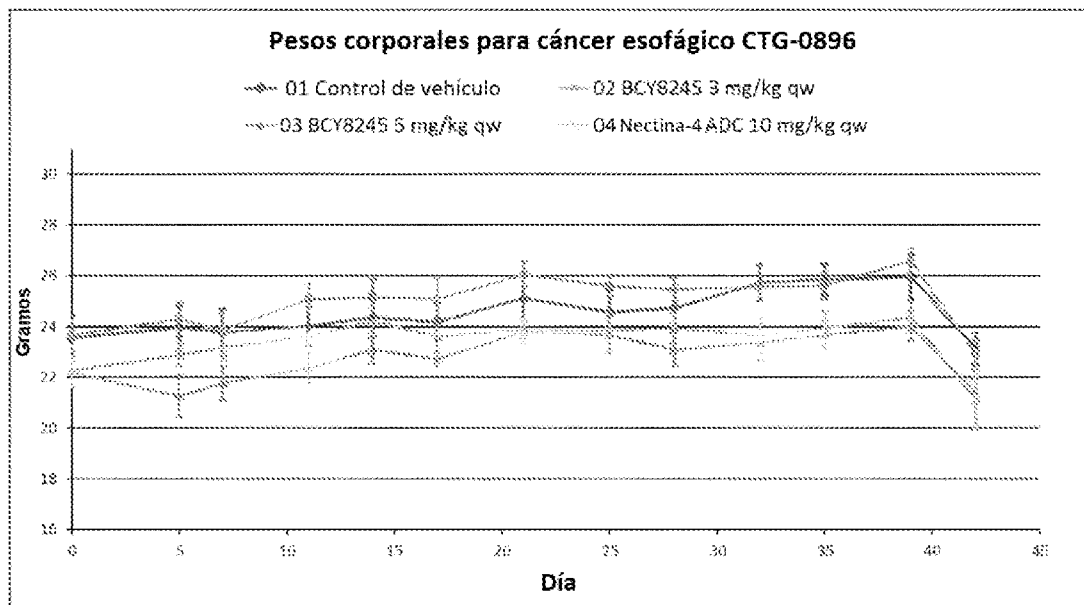


(B)

FIGURA 30



(A)



(B)

FIGURA 31

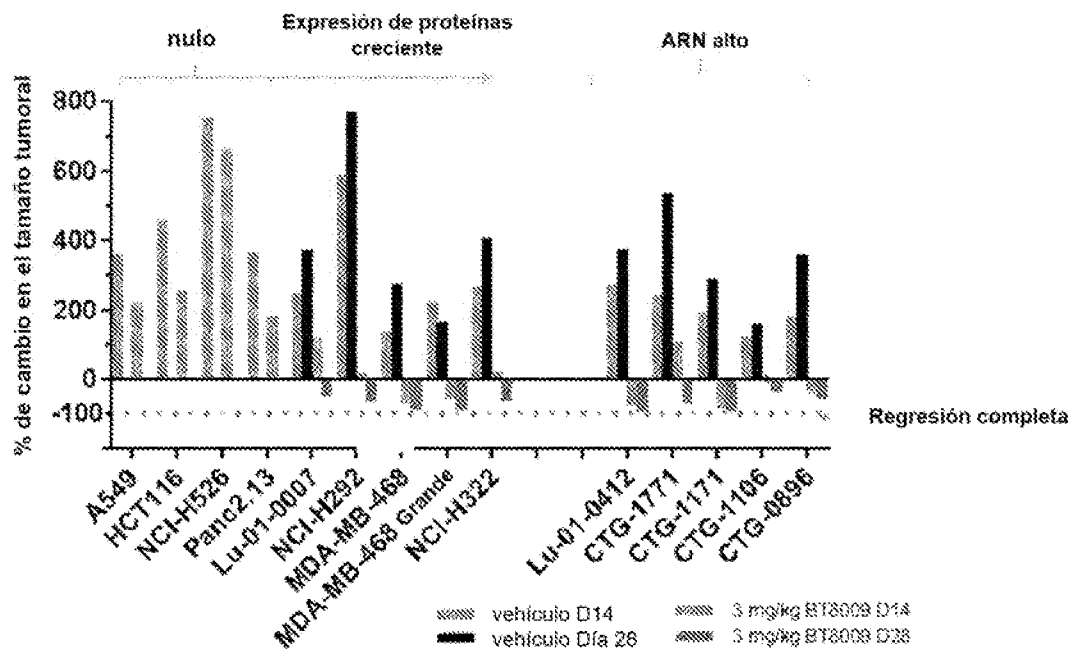


FIGURA 32

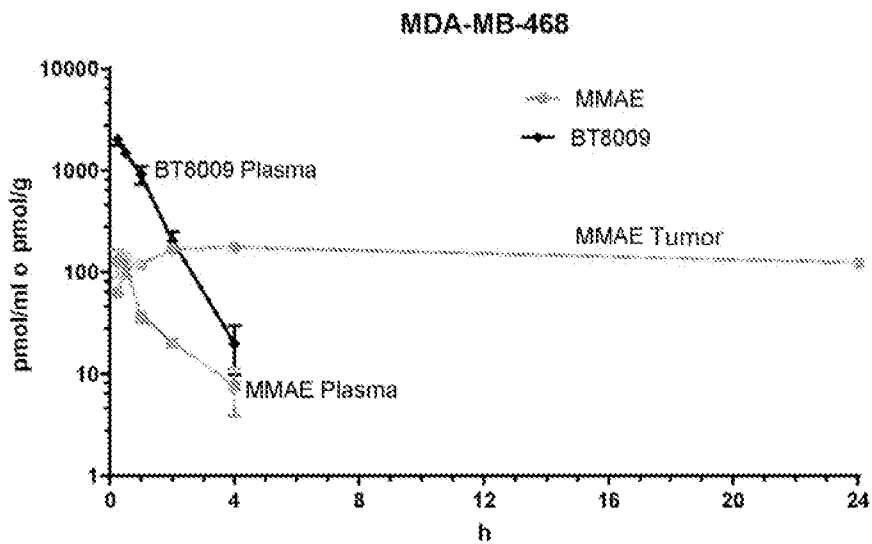
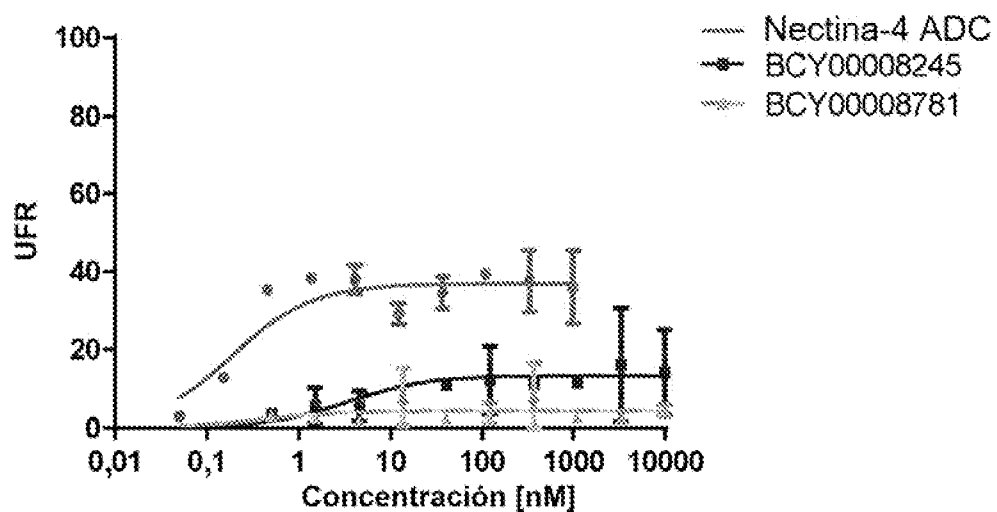


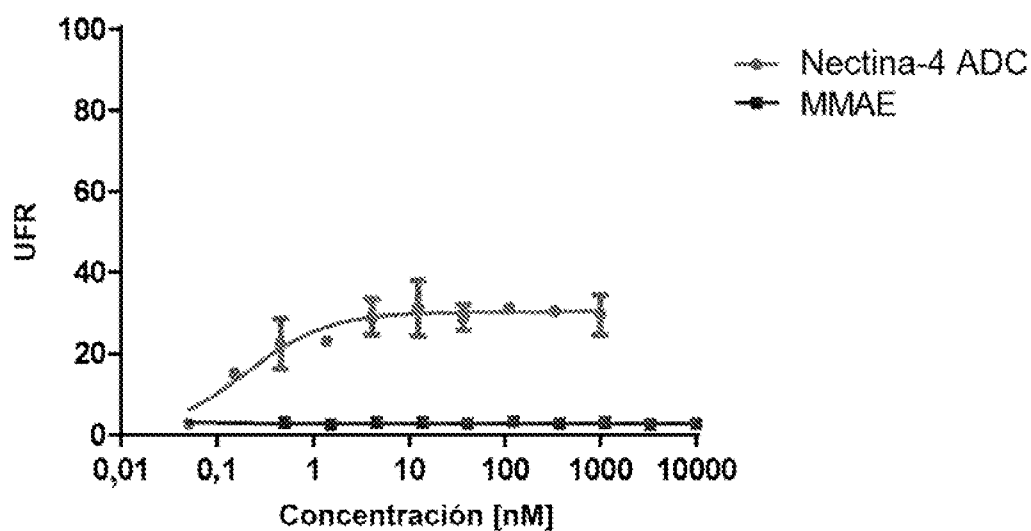
FIGURA 33

Intensidad media CH2 (AVG) [Célula] (Membrana) a 4 °C
 Línea celular: **MDA-MB-468**



(A)

Intensidad media CH2 (AVG) [Célula] (Membrana) a 4 °C
 Línea celular: **MDA-MB-468**



(B)

FIGURA 34