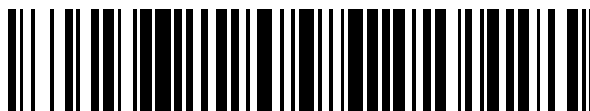


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 865**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/50** (2007.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61K 51/12** (2006.01)  
**A61K 47/65** (2007.01)  
**A61K 47/60** (2007.01)  
**A61K 47/69** (2007.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61K 31/5377** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2015** **PCT/US2015/032565**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015** **WO15183882**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2015** **E 15727248 (5)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3148591**

54 Título: **Conjugados farmacéuticos de nanopartículas**

30 Prioridad:

**29.05.2014 US 201462004738 P**  
**19.12.2014 US 201462094923 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**23.10.2020**

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER  
CENTER (50.0%)**  
**1275 York Avenue**  
**New York, NY 10065, US y**  
**CORNELL UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BRADBURY, MICHELLE S.;**  
**YOO, BARNEY;**  
**WIESNER, ULRICH y**  
**MA, KAI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 788 865 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados farmacéuticos de nanopartículas

5 **Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas**

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de las Solicitudes de Patentes Provisionales de los Estados Unidos Núms. 62/004,738 y 62/094,923, presentadas el 29 de mayo de 2014 y el 19 de diciembre de 2014, respectivamente.

10 **Campo de la invención**

[0002] Esta invención se refiere en general a conjugados de nanopartículas para la administración de agentes terapéuticos (por ejemplo, liberación dirigida de fármacos) para la detección, prevención y tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

15 **Antecedentes de la invención**

[0003] Los vehículos de administración nanoterapéuticos son típicamente sistemas multicomponentes macro o supramoleculares, que varían en tamaño de 1 – 1.000 nm, que son inherentemente terapéuticos (por ejemplo, sin ingrediente farmacéutico activo) o funcionan como sistemas de administración terapéutica. Hasta la fecha, las nanopartículas y biología liposomales comprenden una gran proporción del número de productos aprobados por la FDA o productos en ensayos clínicos utilizados para tratar una variedad de tipos de cáncer, mientras que una serie de formulaciones de partículas basadas en polímeros se encuentran actualmente en ensayos de fase temprana.

[0004] Los candidatos deseables para los sistemas de administración nanoterapéutica comparten una característica común de incorporar y liberar un compuesto farmacológico de manera controlada, lo que puede alterar favorablemente la biodisponibilidad y farmacocinética del fármaco, al tiempo que minimiza las toxicidades fuera de diana. Idealmente, se incorpora una etiqueta de imagen para evaluar su localización y retención precisas en los sitios de la enfermedad.

[0005] Sin embargo, estos sistemas funcionan usando diferentes mecanismos. Por ejemplo, los conjugados de drogas de anticuerpos (ADC) logran una toxicidad de drogas más baja principalmente a través de la selección activa de células tumorales y la liberación condicional de moléculas de drogas. Al unirse a un antígeno de la superficie celular, se produce una liberación activa del fármaco después de la internalización celular y la captación endosómica. Por otro lado, los sistemas de suministro de fármacos basados en polímeros y liposomas, que suelen ser complejos ensamblados mucho más grandes (diámetros de ~20-150 nm) cargados pasivamente con una mayor carga útil (~10,000 moléculas de fármaco para Doxil), generalmente carecen de capacidades de focalización (BIND-014 es una excepción). Por lo tanto, estos complejos se basan principalmente en el conocido efecto de retención y permeabilidad mejorada (EPR) para el suministro exitoso de medicamentos nano formulados. Si bien la penetración intersticial de los liposomas puede ser deficiente debido a su tamaño, el fármaco libre se libera a través de varios mecanismos que no se entienden completamente. Por ejemplo, Abraxano (~140 nm) se basa en un enfoque diferente para mejorar la biodisponibilidad de un compuesto hidrofóbico. En este caso, una formulación específica de albúmina y fármaco (paclitaxel) forma el complejo inicial, que a su vez se dispersa en agregados de proteína-fármaco más pequeños tras la inyección.

[0006] Por lo tanto, existe la necesidad de una plataforma única para el suministro de fármacos que proporcione una bioestabilidad adecuada y exhiba una liberación controlada del compuesto bioactivo en un sitio deseado.

50 **Sumario de la invención**

[0007] En el presente documento se presentan métodos y composiciones de conjugados de fármaco de nanopartículas (NDC), específicamente plataforma de nanopartículas a base de sílice con moléculas de fármaco unidas covalentemente. Un NDC ha sido demostrado como un nanoterapéutico. La combinación de tamaño, composición molecular y química (p. ej., modo de liberación del fármaco) puede aprovechar las propiedades beneficiosas observadas en otros productos nanoterapéuticos con el objetivo de superar los obstáculos clave que obstaculizan las formulaciones tradicionales, incluidos los índices terapéuticos estrechos, las toxicidades limitantes de la dosis y la utilidad clínica limitada.

[0008] En un aspecto, la invención está dirigida a un conjugado de fármaco de nanopartículas (NDC) que comprende: una nanopartícula que tiene un diámetro dentro de un intervalo de 1 nm a 25 nm; un resto enlazador; y un resto de fármaco (p. ej., dasatinib o gefitinib, incluido cualquier análogo del mismo), en donde la nanopartícula está recubierta con un polímero orgánico (p. ej., en donde el polímero orgánico comprende al menos un grupo bifuncionalizado de maleimida sililo-poli(etilenglicol) unido a al menos un constructo de conector-fármaco), y en donde el resto de fármaco y el resto conector forman un constructor de enlace-fármaco escindible (p. ej., a través de una proteasa) que está unido covalentemente a la nanopartícula (p. ej., a través del resto enlazador) (p. ej., en donde el resto de fármaco promedio a la relación de nanopartículas varía de 1 a 20).

**[0009]** En ciertas realizaciones, el resto enlazador comprende uno o más aminoácidos (por ejemplo, un péptido o polipéptido) (por ejemplo, de 1 a 10 aminoácidos). En ciertas realizaciones, el resto enlazador comprende (Amino-(espaciador)<sub>x</sub>)<sub>y</sub>-péptido o (espaciador)<sub>z</sub>-péptido [por ejemplo, dipéptido (por ejemplo, fenilalanina-arginina (Phe-Arg) o fenilalanina-lisina (Phe-Lys))] en donde el espaciador tiene de 2 a 50 átomos (por ejemplo, en donde el espaciador es PEG), en donde x es un número entero de 1 a 5, en donde y es un número entero de 1 a 5, en donde z es un número entero de 5 a 15, y en donde el resto enlazador comprende un resto degradable (por ejemplo, un enlace amida) entre el resto enlazador y el resto del fármaco (por ejemplo, permitiendo la escisión del resto del fármaco en presencia de una proteasa). En ciertas realizaciones, el resto enlazador comprende un espaciador (por ejemplo, polietilenglicol (PEG)), PEG<sub>2</sub>, carbamato de *para*-aminobencilo (PABC)) entre un péptido y el resto del fármaco. En ciertas realizaciones, los NDC comprenden además un compuesto fluorescente (por ejemplo, asociado con la nanopartícula, por ejemplo, dentro del núcleo de la nanopartícula). En ciertas realizaciones, los NDC comprenden además un radiomarcador.

**[0010]** En ciertas realizaciones, el resto enlazador es capaz de experimentar hidrólisis en el extremo C-terminal sobre la unión de proteasa (por ejemplo, serina proteasa (por ejemplo, tripsina), cisteína proteasa (por ejemplo, cathepsina B)), liberando así el resto del fármaco de la nanopartícula).

**[0011]** En ciertas realizaciones, el resto del fármaco comprende un inhibidor del receptor de tirosina quinasa (RTK) (por ejemplo, dasatinib o gefitinib, incluido cualquier análogo del mismo (por ejemplo, cualquier equivalente farmacéutico y/o terapéutico del mismo) modificado para proporcionar la unión al resto enlazador sin perturbar la estructura química subyacente de un sitio de unión activa del resto del fármaco).

**[0012]** En ciertas realizaciones, los NDC comprenden además de 1 a 20 restos dirigidos (p. ej., ácido arginilglicilaspártico cíclico (cRGD)), en donde los restos dirigidos se unen a receptores en las células tumorales.

**[0013]** En ciertas realizaciones, el NDC es un teranóstico.

**[0014]** En ciertas realizaciones, el compuesto fluorescente es Cy5,5.

**[0015]** En ciertas realizaciones, el resto de fármaco está unido al radiomarcador.

**[0016]** En ciertas realizaciones, la nanopartícula comprende además un núcleo a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una porción del núcleo.

### **Breve descripción de los dibujos**

**[0017]**

La Fig. 1A representa estructuras químicas de gefitinib y análogos (APdMG 1 y dPEG<sub>2</sub>APdMG 2).

La Fig. 1B representa una estructura química del fármaco enlazador directamente conectado a través del enlace amida (Phe-Arg-APdMG 3).

La Fig. 1C representa una estructura química del fármaco enlazador conectado a través del espaciador dPEG<sub>2</sub>(Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG 4).

La Fig. 1D representa una estructura química del enlazador-fármaco conectado a través del separador de PABC degradable (Phe-Lys-PABC-APdMG 5)

Las Figs. 2A - 2C muestran los tipos de enlazador.

La Fig. 2A representa que Phe-Arg-APdMG utiliza un enlace amida para la unión del fármaco. Las enzimas reconocen y se unen a la secuencia de dipéptidos (Phe-Arg), luego hidrolizan el enlace amida C-terminal al dipéptido y liberan APdMG 1.

La Fig. 2B muestra que Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG usa dPEG<sub>2</sub>APdMG 2, que incorpora un espaciador de PEG de 10 átomos más largo entre el fármaco y el dipéptido para mejorar la liberación del fármaco.

La Fig. 2C muestra que Phe-Lys-PABC-APdMG utiliza un grupo espaciador *para*-aminobenzoxicarbamato (o PABC) entre el dipéptido (Phe-Lys) y aminopropilo-dMG. Después de la liberación catalizada por enzimas del fármaco espaciador, el espaciador se descompone espontáneamente del fármaco.

Las Figs. 3A - 3C son liberación catalizada de enzimas representativas (tripsina) del fármaco a partir de construcciones de enlazador-fármaco. Los datos indican que APdMG y dPEG<sub>2</sub>APdMG se liberan de las construcciones. Los tiempos de retención se indican entre paréntesis. Los ensayos de tripsina se realizaron a

37°C en tampón fosfato 10 mM (pH 7,2)

La Fig. 3A muestra datos de LCMS de Phe-Arg-APdMG **3** (arriba) y Phe-Arg-APdMG + tripsina durante 60 minutos (abajo).

La Fig. 3B muestra datos de LCMS de Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-APdMG **4** (arriba) y Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-APdMG + tripsina durante 10 minutos (abajo).

La Fig. 3C muestra datos de LCMS de Phe-Arg-PABC-APdMG **5** (arriba) y Phe-Arg-PABC-APdMG + tripsina durante 10 minutos (abajo).

Las Figs. 4A y 4B muestran ensayos de liberación de fármaco *in vitro* para construcciones enlazadoras de fármacos libres Phe-Arg-APdMG, Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG y Phe-Lys-PABC-APdMG, monitoreadas a lo largo del tiempo por HPLC a 348 nm. El % de fármaco libre es el fármaco liberado dividido por la carga de fármaco inicial del constructor enlazador-fármaco determinado a 348 nm.

La Fig. 4A representa construcciones de fármaco enlazador libre tratadas con tripsina. Los ensayos de tripsina se realizaron en tampón fosfato 10 mM (pH 7,2) a 37°C.

La Fig. 4B representa la construcción de fármaco enlazador libre tratada con catepsina B. Los ensayos de catepsina B se realizaron en tampón de acetato de sodio 25 mM (pH 5,0).

Las Figs. 5A y 5B muestran perfiles representativos de HPLC de liberación de fármaco *in vitro* de NDC en presencia de tripsina. Las NDC se trataron con tripsina y luego se analizaron por HPLC después de 5 y 120 min. Los datos indican que los compuestos 2 o 3 se liberan de los C'dots. Los ensayos de tripsina se realizaron en tampón fosfato 10 mM (pH 7,2) a 37°C. Análisis por HPLC a 348 nm.

La Fig. 5A muestra el perfil de HPLC de NDC **6**.

La Fig. 5B muestra el perfil de HPLC de NDC **7**.

Las Figs. 6A y 6B representan la liberación de fármacos *in vitro* desde NDC en presencia de enzimas. Las reacciones enzimáticas se monitorizaron con el tiempo por HPLC a 348 nm. Los ensayos de tripsina se realizaron en tampón fosfato 10 mM (pH 7,2) a 37°C; se realizaron ensayos de catepsina B en tampón de acetato de sodio 25 mM (pH 5,0) a 37°C.

La Fig. 6A muestra la liberación del fármaco de C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **6** tratado con tripsina.

La Fig. 6B muestra la liberación del fármaco de C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdM **7** tratada con catepsina B.

La Fig. 7 muestra el análisis de transferencia Western de células H1650 tratadas con gefitinib. C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **6**, y C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG **7**. Células tratadas con gefitinib o NDC especificado a las concentraciones indicadas para 18 horas seguidas de EGF (50 ng/ml) durante 5 minutos (pEGFR - EGFR fosforilado; tEGFR - EGFR total).

La Fig. 8 muestra radioGPC de C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-Gly-D-Tyr (<sup>131</sup>I)-APdMG **8**. Rendimiento radioquímico de >90% basado en integraciones de pico. Se presume que el pico más pequeño está libre de residuos <sup>131</sup>I.

Las Figs. 9 A y 9B muestran construcciones de enlazador-fármaco, Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-D-Tyr-aminopropilo-dMG y Phe-Lys-PABC-D-Tyr-aminopropilo-dMG que incorporan un residuo de D-tirosina con el componente de fármaco para adjuntando un radiomarcador (compuestos **23** y **24**).

La Fig. 10 muestra el Esquema 1, que ilustra la liberación de fármaco mediada por enzimas del conjugado de fármaco de nanopartículas (NDC).

La Fig. 11 muestra el Esquema 2, que ilustra que los C'dots-(Cy5)-PEG-mal se hacen reaccionar con construcciones enlazadoras de fármacos Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4** y Phe-Lys-PABC-APdMG **5** dando como resultado la NDC C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **6** y C'dot-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG **7**.

La Fig. 12 muestra el Esquema 3, que ilustra un proceso de síntesis de APdMG **1**.

La Fig. 13 muestra el Esquema 4, que ilustra un proceso de síntesis de dPEG<sub>2</sub>APdMG **2**.



La Fig. 14 muestra el Esquema 5, que ilustra un proceso de síntesis de Phe-Arg-APdMG **3** y Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4**.

La Fig. 15 muestra el Esquema 6, que ilustra un proceso de síntesis de Phe-Lys-PABC-APdMG (**5**).

Las Figs. 16A-16D muestra la caracterización de puntos mal-PEG-C y NDC 6 y 7.

La Fig. 16A muestra la HPLC analítica de fase inversa C18 a 348 nm.

La Fig. 16B muestra una imagen TEM.

La Fig. 16C muestra los espectros de absorbancia y emisión.

La Fig. 16D muestra curvas de correlación de FCS.

**[0018]** Las características y ventajas de la presente descripción serán más evidentes a partir de la descripción detallada que se expone a continuación cuando se toma junto con los dibujos, en los que los caracteres de referencia similares identifican elementos correspondientes en todas partes. En los dibujos, los números de referencia similares generalmente indican elementos idénticos, funcionalmente similares y/o estructuralmente similares.

### **Definiciones**

**[0019]** Para que la presente divulgación se entienda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

**[0020]** En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Como se usa en esta solicitud, el término "comprende" y las variaciones del término, tales como "que comprende" y "comprende", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, enteros o etapas. Como se usa en esta aplicación, los términos "acerca de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Todos los números utilizados en esta aplicación con o sin aproximadamente/alrededor de están destinados a cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante.

**[0021]** En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13 %, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo por el contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100% de un valor posible).

**[0022]** El término "administración" se refiere a la introducción de una sustancia en un sujeto. En general, se puede utilizar cualquier vía de administración que incluya, por ejemplo, parenteral (por ejemplo, intravenosa), oral, tópica, subcutánea, peritoneal, intraarterial, inhalación, vaginal, rectal, nasal, introducción en el líquido cefalorraquídeo o instilación en compartimentos del cuerpo. En algunas realizaciones, la administración es oral. Adicionalmente o alternativamente, en algunas realizaciones, la administración es parenteral. En algunas realizaciones, la administración es intravenosa.

**[0023]** El término "agente" se refiere a un compuesto o entidad de cualquier clase química que incluye, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, moléculas pequeñas, metales o combinaciones de los mismos. Como quedará claro por el contexto, en algunas realizaciones, un agente puede ser o comprender una célula u organismo, o una fracción, extracto o componente del mismo. En algunas realizaciones, un agente es o comprende un producto natural en el sentido de que se encuentra y/o se obtiene de la naturaleza. En algunas realizaciones, un agente es o comprende una o más entidades que están hechas por el hombre, ya que está diseñado, configurado y/o producido a través de la acción de la mano del hombre y/o no se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, se puede utilizar un agente en forma aislada o pura; en algunas realizaciones, se puede utilizar un agente en forma cruda. En algunas realizaciones, los agentes potenciales se proporcionan como colecciones o bibliotecas, por ejemplo, que pueden seleccionarse para identificar o caracterizar agentes activos dentro de ellas. Algunas realizaciones particulares de agentes que pueden utilizarse incluyen moléculas pequeñas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, siARNs, shARNs, híbridos de ADN/ARN, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, péptidos, miméticos de péptidos, ácidos nucleicos peptídicos, moléculas pequeñas, etc. En algunas realizaciones, un agente es o comprende un polímero. En algunas realizaciones, un agente contiene al menos un resto polimérico. En algunas realizaciones, un agente comprende un fármaco terapéutico, diagnóstico y/o fármaco.

**[0024]** El término "péptido" o "polipéptido" se refiere a una cadena de al menos dos (por ejemplo, al menos tres) aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones, un polipéptido comprende aminoácidos naturales; alternativamente o adicionalmente, en algunas realizaciones, un polipéptido comprende uno o más aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se encuentran en la naturaleza pero que pueden incorporarse

en una cadena de polipéptidos; véase, por ejemplo, <http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif>, que muestra estructuras de aminoácidos no naturales que se han incorporado con éxito en canales iónicos funcionales) y/o análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica pueden emplearse alternativamente). En algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos en una proteína pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso, un enlazador para conjugación, funcionalización u otra modificación, etc.

**[0025]** Como se usa en el presente documento, el término "asociado" se refiere típicamente a dos o más entidades en proximidad física entre sí, ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de una o más entidades adicionales que sirven como un agente de enlace), para formar una estructura que es suficientemente estable para que las entidades permanezcan en proximidad física en condiciones relevantes, por ejemplo, condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, los restos asociados están unidos covalentemente entre sí. En algunas realizaciones, las entidades asociadas están unidas de forma no covalente. En algunas realizaciones, las entidades asociadas están unidas entre sí por interacciones no covalentes específicas (es decir, por interacciones entre ligandos interactuantes que discriminan entre su compañero de interacción y otras entidades presentes en el contexto de uso, tales como, por ejemplo, interacciones estreptavidina/avidina, interacciones anticuerpo/antígeno, etc.). Alternativa o adicionalmente, un número suficiente de interacciones no covalentes más débiles puede proporcionar suficiente estabilidad para que los restos permanezcan asociados. Las interacciones no covalentes ejemplares incluyen, entre otras, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones huésped-huésped, interacciones hidrofóbicas, interacciones de apilamiento de pi, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, etc.

**[0026]** Como se usa en este documento, los materiales "biodegradables" son aquellos que, cuando se introducen en las células, se descomponen por maquinaria celular (por ejemplo, degradación enzimática) o por hidrólisis en componentes que las células pueden reutilizar o eliminar sin efectos tóxicos significativos sobre las células. En ciertas realizaciones, los componentes generados por la descomposición de un material biodegradable no inducen inflamación y/u otros efectos adversos *in vivo*. En algunas realizaciones, los materiales biodegradables se descomponen enzimáticamente. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, los materiales biodegradables se descomponen por hidrólisis. En algunas realizaciones, los materiales poliméricos biodegradables se descomponen en sus polímeros componentes. En algunas realizaciones, la descomposición de materiales biodegradables (que incluyen, por ejemplo, materiales poliméricos biodegradables) incluye la hidrólisis de enlaces éster. En algunas realizaciones, la descomposición de los materiales (incluidos, por ejemplo, materiales poliméricos biodegradables) incluye la escisión de los enlaces de uretano.

**[0027]** Como se usa en el presente documento, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en donde exhibe una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza. Una molécula biológica puede tener dos funciones (es decir, bifuncionales) o muchas funciones (es decir, multifuncionales).

**[0028]** El término "*in vitro*", como se usa en el presente documento, se refiere a eventos que ocurren en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

**[0029]** Como se usa en el presente documento "*in vivo*" se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo multicelular, tal como un humano y un animal no humano. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (a diferencia de, por ejemplo, los sistemas *in vitro*).

**[0030]** El término "agente de obtención de imágenes", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier elemento, molécula, grupo funcional, compuesto, fragmentos del mismo o resto que facilite la detección de un agente (por ejemplo, una nanopartícula de polisacárido) al que está unido. Los ejemplos de agentes de formación de imágenes incluyen, entre otros: varios ligandos, radionucleidos (p. ej.,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{135}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{187}\text{Re}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , etc.), tintes fluorescentes (para tintes fluorescentes ejemplares específicos, ver más abajo), agentes quimioluminiscentes (como, por ejemplo, ésteres de acridinium, dioxetanos estabilizados y similares), agentes bioluminiscentes, nanocristales semiconductores fluorescentes inorgánicos fluorescentes (p. ej., puntos cuánticos), nanopartículas metálicas (p. ej., oro, plata, cobre, platino, etc.) nanocristales, iones metálicos paramagnéticos, enzimas (para ejemplos específicos de enzimas, ver a continuación), etiquetas colorimétricas (como, por ejemplo, tintes, oro coloidal y similares), biotina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

**[0031]** Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene un diámetro de menos de 1000 nanómetros (nm). En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro de menos de 300 nm, según lo definido por la National Science Foundation. En algunas realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro de menos de 100 nm según lo definido por los Institutos Nacionales de Salud. En algunas realizaciones, las nanopartículas son micelas porque comprenden un compartimento cerrado, separado de la solución a granel por una membrana micelar, típicamente compuesta de entidades anfífilas que rodean y encierran un espacio o compartimento (por ejemplo, para definir un lumen). En algunas realizaciones, una membrana micelar está

compuesta de al menos un polímero, como por ejemplo un polímero biocompatible y/o biodegradable.

**[0032]** Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye humanos y mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, cerdos, gatos, perros y caballos). En muchas realizaciones, los sujetos son mamíferos, particularmente primates, especialmente humanos. En algunas realizaciones, los sujetos son ganado tal como ganado vacuno, ovejas, cabras, vacas, cerdos y similares; aves de corral como pollos, patos, gansos, pavos y similares; y animales domesticados, particularmente mascotas como perros y gatos. En algunas realizaciones (p. ej., particularmente en contextos de investigación) los mamíferos sujetos serán, por ejemplo, roedores (p. ej., ratones, ratas, hámsters), conejos, primates o cerdos, como cerdos endogámicos y similares.

**[0033]** Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratado") se refiere a cualquier administración de una sustancia que alivia parcial o completamente, mejora, revive, inhibe, retrasa el inicio, reduce la gravedad de, y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno y/o afección en particular. Tal tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que exhibe solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o condición. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o condición relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto que ha sido diagnosticado que padece la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto que se sabe que tiene uno o más factores de susceptibilidad que se correlacionan estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevantes.

#### **Descripción detallada**

**[0034]** En el presente documento se describen conjugados de fármacos de nanopartículas (NDC), que, en ciertas realizaciones, comprenden una plataforma de nanopartículas no tóxica, multimodal, clínicamente probada basada en sílice con moléculas/restos de fármacos unidos covalentemente. Los conjugados de drogas en nanopartículas (NDC) demuestran capacidades de imagen y ligandos dirigidos que se eliminan eficientemente a través de los riñones. Además, los conjugados incorporan agentes terapéuticos para la detección, prevención y/o tratamiento del cáncer. Por ejemplo, los NDC que contienen inhibidores específicos de la tirosina quinasa receptora (RTK) se han sintetizado y se ha demostrado que liberan compuestos farmacológicos de manera controlada y predecible. Además, el análisis de transferencia Western muestra niveles reducidos de fosforilación de RTK en las células, lo que sugiere la administración *in vitro* de fármacos basados en NDC.

**[0035]** En algunas realizaciones, la plataforma de nanopartículas a base de sílice comprende nanopartículas ultrapequeñas o "puntos C", que son partículas fluorescentes de cubierta de núcleo de organo-sílice que tienen diámetros controlables hasta el rango inferior a 10 nm con un rango de funcionalidades modulares. Los puntos C se describen en la Patente de Estados Unidos N° 8298677 B2 "nanopartículas a base de sílice fluorescente", Publicación de los Estados Unidos Núm. 2013/0039848 A1 "nanopartículas a base de sílice fluorescente", y la Publicación de los Estados Unidos Núm. US 2014/0248210 A1 "Nanopartículas multimodales a base de sílice", cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Incorporadas en la matriz de sílice del núcleo son moléculas de tinte infrarrojo cercano, tales como Cy5,5, que proporciona sus propiedades ópticas distintas. Rodeando el núcleo hay una capa o capa de sílice. La superficie de sílice se modifica covalentemente con grupos sililo-poli(etilenglicol) (PEG) para mejorar la estabilidad en condiciones acuosas y biológicamente relevantes. Estas partículas se han evaluado *in vivo* y exhiben excelentes propiedades de eliminación debido en gran medida a su tamaño y superficie inerte. Entre las funcionalidades adicionales incorporadas en los puntos C se encuentran la detección química, el contraste de imagen no óptico (PET) y las capacidades de orientación *in vitro/in vivo*, que permiten su uso en la visualización de ganglios linfáticos para aplicaciones quirúrgicas y detección de melanoma en cáncer.

**[0036]** Los puntos C proporcionan una plataforma única para la administración de fármacos debido a sus propiedades físicas, así como a las características *in vivo* humanas demostradas. Estas partículas son ultrapequeñas y se benefician de los efectos de EPR en los microambientes tumorales, al tiempo que retienen el aclaramiento deseado y las propiedades farmacocinéticas. Con este fin, se describe en el presente documento un sistema de administración de fármacos en nanopartículas en donde, en determinadas realizaciones, las construcciones de fármacos se unen covalentemente a puntos C (u otras nanopartículas). Los NDC basados en puntos C para el suministro de fármacos proporcionan una buena bioestabilidad, minimizan la liberación prematura de fármacos y exhiben una liberación controlada del compuesto bioactivo. En ciertas realizaciones, los enlazadores basados en péptidos se usan para aplicaciones de NDC. Estos enlazadores, en el contexto de anticuerpos y polímeros, son estables tanto *in vitro* como *in vivo*, con una cinética de liberación altamente predecible que depende de la hidrólisis catalizada por enzimas por las proteasas lisosómicas. Por ejemplo, la cathepsina B, una proteasa altamente expresada en los lisosomas, puede utilizarse para facilitar la liberación del fármaco desde las macromoléculas. Al incorporar un péptido corto sensible a la proteasa entre el esqueleto macromolecular y la molécula del fármaco, se puede obtener la liberación controlada del fármaco en presencia de la enzima.

**[0037]** En ciertas realizaciones, los NDC son ultrapequeños (por ejemplo, con un diámetro promedio de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 10 nm, (por ejemplo, aproximadamente 6 nm)) y utilizan enlazadores

sensibles a enzimas, por ejemplo, donde la liberación del fármaco es catalizada por proteasas. En un ejemplo, gefitinib, un importante medicamento para el cáncer del inhibidor del factor de crecimiento epidérmico mutante (EGFRmt+)-inhibidor de la tirosina quinasa (TKI), se modificó e incorporó a las partículas. Los NDC resultantes exhibieron excelente estabilidad *in vitro*, solubilidad, y demostraron ser activos en células NSCLC que expresan EGFRmt+.

**[0038]** En ciertas realizaciones, los NDC comprenden uno o más restos de direccionamiento, por ejemplo, para orientar un tipo de tejido particular (por ejemplo, un tumor particular). Los NDC con restos diana mejoran la internalización de fármacos en las células tumorales (p. ej., los ligandos dirigidos se unen a receptores en las células tumorales y/o administran fármacos a las células tumorales (p. ej., permeabilidad)). Por ejemplo, para crear una partícula terapéutica con un resto de direccionamiento adicional (p. ej., CRGD), se añaden nanopartículas de sílice a una mezcla de conjugados de cRGDY-PEG y PEG bifuncionalizados de maleimida. Los PEG bifuncionalizados de maleimida apoyan la unión adicional de conjugados de fármaco-enlazador para crear un producto teranóstico.

**[0039]** En algunas realizaciones, las partículas ultrapequeñas pueden estar asociadas con etiquetas de PET y/o sondas ópticas. Las nanopartículas pueden observarse *in vivo* (por ejemplo, a través de PET) para evaluar la acumulación de fármacos en un sitio diana. Por ejemplo, las nanopartículas con etiquetas de PET (p. ej., sin sustancias farmacológicas) pueden administrarse primero. Luego, al analizar las imágenes PET *in vivo* de las nanopartículas, se puede estimar la concentración del fármaco (p. ej., conjugado con nanopartículas) y la tasa de acumulación en el tumor. La dosis puede determinarse en función de la estimación obtenida para proporcionar medicamentos personalizados (por ejemplo, el tamaño del tumor en lugar del peso corporal del paciente). En algunas realizaciones, un fármaco radiomarcado puede rastrearse *in vivo*. Un medicamento de quimioterapia altamente concentrado es potencialmente peligroso si no está dirigido. En algunas realizaciones, las nanopartículas con sondas ópticas (p. ej., fluoróforo) pueden usarse para obtener imágenes intraoperatorias (p. ej., donde la superficie del tejido/tumor está expuesta) y/o biopsias de tumores.

**[0040]** El agente terapéutico y la nanopartícula se pueden radiomarcarse o etiquetar ópticamente por separado, permitiendo un control independiente del agente terapéutico y la nanopartícula. En una realización, dasatinib radiofluorado (es decir,  $^{18}\text{F}$ ) se acopla con restos PEG-3400 unidos a la nanopartícula a través de enlaces éster NHS. La radiofluorina es crucial para poder controlar de forma independiente los cambios dependientes del tiempo en la distribución y liberación del fármaco desde la nanopartícula fluorescente (Cy5) radioyodada C24I. De esta forma, se puede controlar el fármaco profesional (dasatinib) y las nanopartículas. Esto permite la optimización del diseño del profármaco en comparación con los métodos de la técnica anterior en los que no se utiliza un enfoque de doble etiquetado. En otra realización, las moléculas de yodo radioterapéutico (p. ej.,  $^{131}\text{I}$ ) u otros emisores terapéuticos gamma o alfa, se conjugan con PEG a través de un grupo funcional maleimida, donde el agente terapéutico puede no disociarse del PEG *in vivo*.

**[0041]** Los NDC son compuestos farmacológicos unidos covalentemente a nanopartículas de punto C (u otras nanopartículas) a través de un conector molecular. En ciertas realizaciones, los enlazadores incorporan secuencias peptídicas (por ejemplo, dipéptido) sensibles a la tripsina (enzima de control) y/o cathepsina B, que es una enzima que se encuentra predominantemente en los lisosomas de las células. Los experimentos que involucran dos clases de químicas de enlazador se describen aquí para la liberación controlada del fármaco: uno que incorpora un enlace amida entre el enlazador y el fármaco; y otro que utiliza un resto degradable entre el enlazador y el fármaco. En algunas realizaciones, los enlazadores están diseñados para liberar el fármaco de la nanopartícula (por ejemplo, punto C) en condiciones particulares, por ejemplo, hidrólisis proteolítica.

**[0042]** Los fármacos de ejemplo que pueden usarse incluyen inhibidores de RTK, tales como dasatinib y gefitinib, pueden dirigirse al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) o EGFRmt+ expresado por células tumorales primarias de origen humano o murino (por ejemplo, modelos de ratón genéticamente modificados) de glioma de alto grado, neuroesferas de explantes de tumores cerebrales de pacientes humanos) y/o líneas celulares tumorales de origen no neural. Los análogos de dasatinib y gefitinib se pueden sintetizar para permitir la unión covalente a varios conectores sin perturbar la estructura química subyacente que define el sitio de unión activo.

**[0043]** Se validaron los enfoques sintéticos y se obtuvieron las construcciones de enlazador-fármaco y NDC deseados. También se desarrollaron métodos de HPLC/LCMS para la caracterización de NDC y los ensayos de liberación de enzimas. Los ensayos de liberación de fármacos enzimáticos *in vitro* revelaron una serie de factores estructurales importantes en el diseño de NDC. Por ejemplo, el espacio entre el punto C y el enlazador se varió usando cadenas de PEG de diferentes tamaños, y reveló que el espacio suficiente entre el punto C y el enlazador era importante para permitir la liberación del fármaco catalizado por enzimas. De manera similar, también se descubrió que la separación entre el conector y el fármaco es importante para la liberación mediada por enzimas. Además, los diseños de enlazadores que utilizan un resto degradable entre el enlazador y el fármaco exhibieron una cinética de liberación significativamente más rápida que aquellos en los que se usó un enlace amida simple. En algunas realizaciones, el resto degradable puede ser un carbohidrato y/o cualquier enlazador que pueda escindirse y/o activarse enzimáticamente.

**[0044]** Se realizaron también ensayos basados en células. Las construcciones de fármaco enlazador y los NDC que incorporan análogos de dasatinib o gefitinib se probaron frente a células tumorales cerebrales primarias (neuroesferas)

y/o líneas de células tumorales que metastatizan al cerebro (por ejemplo, cáncer de pulmón, células escamosas). Los niveles de fosforilación de EGFRmt + se redujeron o eliminaron en líneas celulares expuestas a NDC, así como a las construcciones de fármaco enlazador libre, y los NDC exhibieron una actividad inhibidora más potente que el fármaco nativo en algunos casos.

**[0045]** En un aspecto, un conjugado de fármaco de nanopartículas (NDC) que comprende un resto de fármaco, un resto conector y una nanopartícula, en donde el resto de fármaco está unido covalentemente a la nanopartícula a través del resto conector se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el NDC comprende un enlace amida y/o un resto degradable entre el resto conector y el resto del fármaco. En ciertas realizaciones, el resto conector comprende un péptido (por ejemplo, un dipéptido). En ciertas realizaciones, el resto enlazador proporciona hidrólisis en el extremo C-terminal tras la unión de la proteasa, liberando así el resto del fármaco de la nanopartícula. En ciertas realizaciones, el resto del fármaco comprende un inhibidor del receptor de tirosina quinasa (RTK) (por ejemplo, dasatinib o gefitinib, que incluye cualquier análogo del mismo, por ejemplo, cualquier equivalente farmacéutico y/o terapéutico del mismo, modificado para proporcionar la unión al resto del engarce sin perturbar la estructura química de un sitio de unión activa del resto del fármaco). En ciertas realizaciones, la nanopartícula es un punto C de nueva generación o un punto C. En otro aspecto, la invención se dirige a un método de detección, prevención y/o tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) que comprende la administración y/o detección del NDC de cualquiera de las realizaciones descritas aquí.

**[0046]** Los vehículos de suministro de drogas de tamaño nanométrico son atractivos debido a (1) sus tamaños pequeños, lo que permite el tráfico por todo el cuerpo así como también dentro de las células; (2) su alta relación superficie/volumen, lo que permite la carga y liberación de carga; y (3) sus químicas de superficie sintonizables, mejorando la solubilidad, controlando la unión e incorporando funcionalidades biológicamente activas.

**[0047]** La administración *in vivo* del fármaco de nanopartículas está plagada de una serie de desafíos biofísicos y bioquímicos que pueden causar absorción de partículas (opsonización), excreción (riñones) o pérdida no específica (extravasación), y evitan que la carga terapéutica llegue a las células deseadas. Uno de los parámetros clave de una construcción de suministro de fármacos es su tamaño físico, donde las partículas más pequeñas (por ejemplo, partículas menores o iguales a aproximadamente 5 nm de diámetro hidrodinámico) pueden extravasarse de manera no específica, mientras que partículas o agregados mucho más grandes (por ejemplo, partículas o los agregados mayores o iguales a aproximadamente 500 nm de diámetro) pueden alojarse en la microvasculatura, en lugar de ser traficados a sus objetivos previstos. Para los materiales no biodegradables, se encuentra que hay un rango de diámetro preferible de 5 nm a 10 nm que permite la filtración renal como un medio para la eliminación de partículas, al tiempo que limita la velocidad del aclaramiento renal para permitir la farmacocinética deseada. Además, se encontró que las partículas de este régimen de tamaño también pueden aprovechar un efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR), es decir, la acumulación pasiva de macromoléculas en microambientes tumorales debido a la vasculatura permeable.

**[0048]** Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se probó en seres humanos un tamaño ultra pequeño (p. ej., que tenga un rango de diámetro de 5 nm a 10 nm) como se describe en la Publicación de los Estados Unidos Núm. 2014/0248210 A1, que se incorpora por referencia en su totalidad. En este ejemplo, cinco pacientes no tuvieron eventos adversos y el agente fue bien tolerado durante el período de estudio. El comportamiento farmacocinético, expresado como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g), en comparación con el tiempo posterior a la inyección y las dosis medias absorbidas de órganos correspondientes, fueron comparables a las encontradas para otros radiotrazadores de diagnóstico comúnmente utilizados. Las imágenes de PET en serie de este paciente representativo mostraron una pérdida progresiva de la presunta actividad de la acumulación de sangre de los principales órganos y tejidos, sin una actividad apreciable por 72 horas después de la inyección (p.i.). Se estimó que tiempos medios de aclaramiento del cuerpo entero en estos pacientes oscilaba entre 13 y 21 horas. Curiosamente, no hubo una localización notable en el hígado, el bazo o la médula ósea, en contraste con muchas moléculas hidrofóbicas, proteínas y plataformas de partículas más grandes (más de 10 nm). Aunque los pacientes fueron tratados previamente con yoduro de potasio (KI) para bloquear la absorción de tejido tiroideo, se obtuvo una dosis tiroidea absorbida promedio más alta en este paciente en relación con otros tejidos. Las partículas también fueron excretadas principalmente por los riñones, con la pared del riñón y la vejiga (después de la tiroides y el tumor, ver más abajo), demostrando uno de los valores más altos de % ID/g en 72 horas p.i.; como suele ser el caso de radiofármacos por excreción renal, la pared de la vejiga recibió una dosis absorbida promedio más alta que otros órganos y tejidos principales. Estos hallazgos resaltan el hecho de que la excreción renal, en lugar de hepatobiliar, es la ruta predominante de eliminación del cuerpo.

**[0049]** El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se usa para terapia dirigida. Se han encontrado mutaciones de EGFR que resultan en la activación constitutiva en 10-35% del cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásicas (CPCNP), y aunque los inhibidores de EGFR son efectivos para la enfermedad sistémica, el control de las metástasis cerebrales sigue siendo limitado por la administración de fármacos. Las mutaciones de EGFR también se encuentran en el 40-50% del glioblastoma primario multiforme (GBM), dos formas prevalentes de cáncer cerebral. Si bien los inhibidores de la tirosina quinasa EGFR (TKI), como el gefitinib, han demostrado ser prometedores en entornos preclínicos, han demostrado ser en gran medida ineficaces en pacientes con cáncer cerebral, probablemente debido a la penetración deficiente del tejido o del sistema nervioso central (SNC) y la toxicidad limitadora de la dosis.

**[0050]** El gefitinib se une e inhibe el sitio activo del dominio quinasa de EGFR. Para utilizar gefitinib en el contexto de los NDC, es importante incorporar un grupo químicamente reactivo que no perturbe significativamente la unión del fármaco al dominio de la quinasa. Los estudios de rayos X cristalográficos y SAR revelaron que reemplazar el grupo morfolino con una amina no altera significativamente la actividad del fármaco, pero proporciona la funcionalidad química necesaria (amina) para la modificación y eventual unión covalente al punto C o punto C' (Fig. 1A).

### Ejemplos experimentales

**[0051]** Un ejemplo demuestra una síntesis ejemplar de conjugados de fármacos de nanopartículas (por ejemplo, plataforma de nanopartículas a base de sílice con moléculas de fármacos unidas covalentemente) y su caracterización y evaluaciones biológicas preliminares.

**[0052]** Con la disponibilidad comercial de des-morfolino-gefitinib (dMG), se obtuvo el aminopropilo-dMG (APdMG) deseado a través de una sustitución nucleófila (por ejemplo, en un paso) de bromuro de amino propilo protegido con Boc, seguido de desprotección ácida (Fig. 1A, Fig. 10 (Esquema 1)). Además, el análogo **2** de gefitinib, que se describe con más detalle a continuación, se obtuvo fácilmente de **1** mediante el acoplamiento de Fmoc-dPEG2-COOH, con una etapa de desprotección de base posterior (Fig. 1A, Fig. 11 (Esquema 2)). Para garantizar que APdMG **1** y dPEG<sub>2</sub>APdMG **2** hayan retenido la actividad contra EGFR, las células H1650 se trataron con los compuestos y se analizaron mediante transferencia Western para evaluar los niveles de fosfo-Tyr168 en EGFR. Las células H1650 son una línea modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas derivadas de tumores humanos (CPCNP) (carcinoma bronquioalveolar), que contienen un EGFR mutado (L858R y ΔE746-A750) que produce la actividad constitutiva del receptor. Ambos compuestos mostraron efectos similares al gefitinib, con la inhibición de phospho-Tyr<sup>168</sup> en concentraciones de 1 y 10 μM, mientras que dPEG<sub>2</sub>APdMG **2** mostró una actividad reducida.

**[0053]** Se investigaron tres tipos de enlazadores para la administración de fármacos basada en punto C (Fig. 1B - 1D). Los tres tipos de enlazadores incluyen secuencias de dipéptidos que utilizan proteasas para la liberación del fármaco. Las proteasas reconocen y se unen al dipéptido que conduce a la hidrólisis en el extremo C-terminal, liberando el componente del fármaco del conector. Se usaron dos proteasas modelo para evaluar las construcciones de fármaco enlazador descritas aquí, la tripsina y la cathepsina B. La tripsina se seleccionó como una serina proteasa representativa. Es altamente activo contra péptidos que contienen aminoácidos básicos como la arginina y la lisina, y escinde C-terminal para estos residuos. La cathepsina B es una cisteína proteasa con una especificidad de sustrato más estricta. La secuencia consenso mínima del sustrato descrita hasta la fecha es un motivo dipéptido que contiene residuos hidrófobos y básicos. Similar a la tripsina, la cathepsina B escinde el terminal C al aminoácido básico. Los dipéptidos fenilalanina-arginina (Phe-Arg) y fenilalanina-lisina (Phe-Lys) son los motivos de reconocimiento de tripsina/cathepsina B para la tripsina y la cathepsina, y se incluyen en las construcciones de enlazador de fármacos (Figs. 1B-D).

**[0054]** El Phe-Arg-APdMG es un ejemplo de un enfoque para obtener un constructo enlazador-fármaco sensible a la proteasa (Fig. 2A y 2B). En dicho diseño, el análogo de gefitinib **1** se une directamente al extremo C de la secuencia de dipéptidos. El compuesto **3** se sintetizó usando métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), seguido de modificación del terminal C con **2**, y una etapa de desprotección final que produjo **3** (Fig. 11 (Esquema 3)).

**[0055]** Dada la proximidad del componente del fármaco al motivo del dipéptido, se abordaron los posibles problemas estéricos que podrían impedir que la enzima se una e hidrolice el fármaco conector. Para aumentar la distancia entre el dipéptido y el fármaco, se modificó APdMG **1** para obtener dPEG<sub>2</sub>APdMG **2** (Fig. 13, (Esquema 4)). Una reacción de acoplamiento entre el componente dipéptido y dPEG<sub>2</sub>APdMG **2**, seguida de una etapa de desprotección, proporcionó Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4**, un constructor de fármaco conector que contiene un espaciador de PEG corto de 10 átomos entre el Phe-Arg y el análogo de gefitinib.

**[0056]** Para retener la mayor separación entre el dipéptido y los componentes del fármaco sin introducir cambios estructurales en APdMG **1**, se sintetizó Phe-Lys-PABC-APdMG **5**. Este conector incorpora un grupo auto-inmolativo de para-aminobenciloxi carbamato (PABC) entre el péptido y el fármaco (Figs. 1D y 2A-2C). Tras la hidrólisis enzimática, este grupo se descompone adicionalmente en alcohol para-aminobencílico y CO<sub>2</sub>, liberando de este modo el APdMG. La síntesis del compuesto **5** comienza con Fmoc-Lys (Mtt)-OH (Fig. 13 (Esquema 6)). El aminoácido protegido se modifica con alcohol para-aminobencílico dando Fmoc-Lys (Mtt)-PABA **18**. Tras la eliminación del grupo Fmoc y el acoplamiento con Fmoc-Phe-OH, el dipéptido protegido, Fmoc-Phe-Lys (Mtt)-PABA **19** se forma. El grupo hidroxilo libre del -PABA se activa luego con cloruro de carbonato de para-nitrofenol que conduce a un carbonato **20** activado, que luego reacciona con APdMG **1** dando como resultado el compuesto **21**. Después de una ronda de desprotección y acoplamiento, se obtuvo el compuesto **22**. La etapa de desprotección final requirió condiciones ácidas. Sin embargo, el grupo carbamato de para-aminobenciloxi en sí mismo es susceptible de descomposición en tales condiciones (por ejemplo, condiciones ácidas). Se encontró que condiciones suficientemente suaves (p. ej., TFA al 0,5%) eliminan el grupo Mtt de la lisina y el grupo Mmt del tiol terminal mientras preservan el enlazador para proporcionar el producto deseado **16**. El grupo Mtt que enmascara la cadena lateral de lisina es muy adecuado para este enfoque sintético general, ya que es estable en presencia de cloruro de carbonato de para-nitrofenol pero lábil para su eliminación en condiciones ácidas leves. Esto está en contraste con el grupo Mmt hiperlábil más comúnmente

usado para la protección de la cadena lateral de la lisina, que se eliminó fácilmente en presencia de cloruro de carbonato de para-nitrofenol.

**[0057]** Para evaluar las tres construcciones de fármaco enlazador, los compuestos 3 - 5 se sometieron a hidrólisis enzimática (Tabla 1, Figs. 3A - 3C, 4A y 4B). Las construcciones de enlazador de drogas se incubaron con tripsina o catepsina B y la reacción se controló por HPLC o LCMS. La tripsina fue activa contra las tres construcciones: en 60 minutos se observó una hidrólisis completa de Phe-Arg-APdMG **3** que resultó en APdMG **1**; solo 10 minutos para la liberación completa de dPEG<sub>2</sub>APdMG **2** de Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4**, y la liberación de APdMG **1** de Phe-Lys-PABC-APdMG **5**. Sin embargo, cuando las construcciones se trataron con catepsina B, no se observó hidrólisis para Phe-Arg-APdMG **3**, mientras que Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4** se hidrolizó por completo, lo que condujo a la liberación de dPEG<sub>2</sub>APdMG **2**.

**[0058]** La tabla 1 a continuación ilustra las semividas obtenidas mediante el ensayo de liberación de fármaco para construcciones de enlazador-fármaco.

**Tabla 1**

Sustrato	Tripsina $t_{1/2}^a$ (min)	Catepsina B $t_{1/2}^a$ (min)
Phe-Arg-APdMG ( <b>3</b> )	9	NH
Phe-Arg-dPEG <sub>2</sub> APdMG ( <b>4</b> )	2	110
Phe-Lys-PABC-APdMG ( <b>5</b> )	1	1
NH - sin hidrólisis		
<sup>a</sup> Tiempo en que el 50% del fármaco se libera del enlazador o partícula según lo determinado por HPLC en 348 nm.		

**[0059]** Se realizaron ensayos *in vitro* para los compuestos **3-5** para obtener perfiles de liberación del fármaco y se monitorizó la hidrólisis mediada por enzimas de las construcciones a lo largo de diferentes puntos de tiempo (Figuras 4A y 4B). Para el Phe-Arg-APdMG **3**, el 50% del fármaco APdMG **1** se liberó en 9 min, mientras que el Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4** fue notablemente más rápido con un 50% de liberación del fármaco en 2 min. El compuesto **5** también fue rápido, requirió menos de 1 minuto para una liberación del fármaco del 50%. En presencia de catepsina B, el Phe-Arg-APdMG **3** demostró ser un sustrato pobre, ya que no se observó liberación de fármaco. Para el Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4**, el 50% del fármaco se liberó en 110 minutos. El Phe-Lys-PABC-APdMG **5** requirió <1 minuto para el fármaco al 50%, lo que sugiere que es un sustrato altamente eficiente para la enzima.

**[0060]** Tanto para la tripsina como para la catepsina B, la velocidad de liberación del fármaco para las tres construcciones de fármaco enlazador sigue la misma tendencia general: Phe-Lys-PABC-APdMG **5** > Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4** > Phe-Arg-APdMG **3** (más rápido a más lento). Los resultados para Phe-Arg-APdMG **3** y Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG **4** sugieren que la proximidad del fármaco a la unidad de dipéptidos afecta la actividad enzimática y la liberación del fármaco. La hidrólisis (liberación del fármaco) aumenta cuando la separación (distancia) entre el fármaco y el dipéptido aumenta a través de la incorporación de un grupo PEG de 10 átomos. Este efecto se observa más prominentemente con la catepsina B, que no puede hidrolizar la construcción **3**. Sin embargo, al incorporar el separador de PEG de 10 átomos entre el fármaco y el dipéptido **4**, se observa hidrólisis y liberación del fármaco.

**[0061]** Para preparar los NDC, se sintetizaron puntos C funcionalizados con maleimida (puntos C (Cy5)-PEG-mal). Los silanos modificados con el fluoróforo Cy5 se prepararon y se valoraron con tetrametilortosilano (TMOS) en una solución diluida de NH<sub>4</sub>OH (relación molar TMOS: Cy5: NH<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>O es 1:0,001:0,44:1215) y se dejaron mezclar durante 24 horas (Urata C, Aoyama Y, Tonegawa A, Yamauchi Y, Kuroda K. Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silica nanoparticles. Chem Commun (Camb). 2009; (34): 5094-6) (Yamada H, Urata C, Aoyama Y, Osada S, Yamauchi Y, Kuroda K. Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behaviour in Static Aqueous Systems, Chem. Mater. 2012; 24 (8): 1462-71.) (Wang J, Sugawara-Narutaki A, Fukao M, Yokoi T, Shimojima A, Okubo T. Two-phase synthesis of monodisperse silica nanospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly. ACS Appl Mater Interfaces. 2011; 3 (5): 1538-44.) Esto dio como resultado una partícula de sílice encapsulada Cy5, cuya superficie se PEGiló y se funcionalizó con grupos maleimida por tratamiento con PEG-silano (500 g/mol) (Suzuki K, Ikari K, Imai H. Synthesis of silica nanoparticles having a well-ordered mesostructured using a double surfactant system. J Am Chem Soc. 2004; 126 (2): 462-3.) y maleimida-PEG-silano (relación molar PEG-silano: TMOS: mal-PEG-silano de 1:2,3:0,006). Después de 48 horas, la mezcla de reacción se dializó, filtró y purificó por filtración en gel. Las nanopartículas se caracterizaron por espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y HPLC analítica para diámetro, morfología y pureza general, respectivamente. Los puntos C resultantes tenían menos de 10 nm de diámetro con distribuciones de tamaño de partícula estrechas (Figs. 16A-16D).

**[0062]** Los NDC que incorporan los fármacos enlazadores **4** y **5** (por ejemplo, punto C-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG (**6**) y punto C-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG (**7**)) se obtuvieron agregando Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG (**4**) y Phe-Lys-PABC-APdMG (**5**) a los puntos C-(Cy5)-PEG-mal para permitir que los tioles terminales en las construcciones reaccionen con grupos maleimida en las partículas (Esquema 2). Los productos de NDC se

aislaron después de la purificación por filtración en gel y produciendo NDC **6** y **7** y se caracterizaron por TEM y HPLC (Fig. 16A y Fig. 16B). Se usó HPLC analítica para evaluar la presencia de contaminantes, así como para determinar el número de moléculas de fármaco por partícula o relación de fármaco a partícula (DPR) (Tabla 2). La concentración de análogos de gefitinib se puede medir fácilmente a 348 nm, mientras que las concentraciones de partículas se pueden obtener a 650 nm, debido a la Cy5 incrustada dentro de los puntos C. Si bien el DPR promedio demostró ser modesto, los NDC exhibieron una heterogeneidad medible donde las estimaciones de DPR variaron de menos de 1 a más de 15. No se observaron precipitaciones de NDC, como podría esperarse debido a la escasa solubilidad de los análogos de gefitinib. Se usó FCS para evaluar cambios en el tamaño de partícula debido a la conjugación de fármaco conector. Como se muestra en la Tabla 2, los NDC mostraron un aumento mínimo en el diámetro sobre el punto base de mal-C.

**[0063]** La Tabla 2 a continuación ilustra un resumen de la caracterización de nanopartículas.

**Tabla 2**

Partícula	Diámetro <sup>a</sup> (nm)	DPR Promedio <sup>b</sup> (intervalo)
Punto C'-(Cy5)-PEG-Mal	6,3	-
Punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG <sub>2</sub> APdMG ( <b>6</b> )	6,4	5 (1-15)
Punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG ( <b>7</b> )	6,5	2 (1-15)
DPR - relación fármaco/partícula		
<sup>a</sup> Determinado por FCS		
<sup>b</sup> Determinado por HPLC		

**[0064]** La liberación del fármaco dependiente de la enzima a lo largo del tiempo se midió para punto C-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG y punto C-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG para obtener perfiles de liberación de fármaco *in vitro*. (Figs. 6A y 6B). Los datos representativos de HPLC que demuestran la liberación del fármaco con tripsina se muestran en las Figs. 5A y 5B. Los NDC **6** y **7** fueron excelentes sustratos para la tripsina, requiriendo 44 min y 6 min, respectivamente, para lograr una liberación del fármaco del 50% (Fig. 6A, Tabla 1). En presencia de catepsina B, la cinética de liberación fue marcadamente más lenta para ambos NDC: el 50% de la liberación del fármaco se logró en 560 min para NDC **6** y 510 min para NDC **7** (Fig. 6B, Tabla 1). Tomados en conjunto, los datos demuestran la accesibilidad de las construcciones de enlazador-fármaco en la superficie de la partícula, lo que conduce a la liberación controlada de los componentes del fármaco.

**[0065]** Se evaluaron las estabildades de los NDC en condiciones acuosas a pH ácido y neutro (5,0 y 7,2) a 37°C. Tanto el NDC **6** como el **7** no mostraron degradación ni liberación del fármaco durante 48 horas, según lo medido por HPLC. Las conjugaciones basadas en tiol-maleimida han recibido escrutinio debido a la pérdida observada de construcciones de fármaco enlazador de conjugados de fármaco de anticuerpo debido a posibles reacciones de intercambio inverso de Michael o tiol que pueden ocurrir *in vivo*. Para evaluar la estabilidad *in vitro* de los NDC en presencia de exceso de tioles, se incubó NDC7 con glutionato 30 mM a 37°C durante 48 horas a pH 7,2. Menos del 5% del fármaco conector se separó del punto C después de 48 horas (Tabla 4).

**[0066]** La Tabla 3 a continuación ilustra las semividas obtenidas por el ensayo de liberación de fármaco para construcciones de enlazador-fármaco.

**Tabla 3**

Sustrato	Tripsina $t_{1/2}$ <sup>a</sup> (min)	Catepsina B $t_{1/2}$ <sup>a</sup> (min)
Punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG <sub>2</sub> APdMG ( <b>6</b> )	44	560
Punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG ( <b>7</b> )	6	510
<sup>a</sup> Tiempo en que el 50% del fármaco se libera del enlazador o partícula. Determinado por HPLC		

**[0067]** La Tabla 4 a continuación ilustra los datos de estabilidad de NDC.

**Tabla 4**

Partícula	pH 5,2 <sup>a</sup> 48 h	pH 7,2 <sup>b</sup> 48 h	Glutaciona <sup>c</sup> 48 h	Medios 18 h
NDC <b>6</b>	~ 1%	~ 2%	~ 5%	< 5%
NDC <b>7</b>	~ 6%	~ 2%	~ 4%	< 1%
<sup>a</sup> tampón de acetato de sodio 25 mM				
<sup>b</sup> tampón fosfato 50 mM				
<sup>c</sup> glutatión 10 mM (reducido) en tampón fosfato 50 mM				
<sup>d</sup> DEM, sin suero, 18 horas después del tratamiento celular				



**[0068]** Las actividades biológicas de punto C-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG y punto C-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-APdMG se evaluaron mediante el tratamiento de células H1650 seguido de detección de transferencia Western de fosfo-Tyr<sup>168</sup> en EGFR y en comparación con gefitinib. Las células privadas de suero se incubaron con cada compuesto durante un período de 18 horas, luego se sometieron a estimulación con EGF. El control de gefitinib exhibió una disminución dependiente de la dosis en la fosforilación de EGFR Tyr<sup>168</sup> con ablación completa a 1 µM (Fig. 7). Los NDC **6** y **7** también mostraron inhibición dependiente de la dosis; las células tratadas con NDC **6** mostraron niveles detectables de fosfo-Tyr<sup>168</sup> a 10 µM. En contraste, NDC**7** exhibió una buena actividad, con una reducción significativa de fosfo-Tyr<sup>168</sup> a 100 nM, y una ablación completa a concentraciones de NDC de 1 µM. Dada la posibilidad de que se produzca la liberación prematura del fármaco y conduzca a las disminuciones observadas en el EGF fosfo-Tyr<sup>168</sup>, se monitoreó la estabilidad de los NDC utilizados en estos ensayos. La HPLC analizó una parte alícuota de los medios con NDC **6** o **7** (10 µM) utilizados para tratar las células H1650 durante 18 horas. Ambas partículas demostraron ser estables en estas condiciones ya que no se detectó fármaco libre en los medios y las NDC estaban intactas (Tabla 3). Además de los NDC **6** y **7**, se investigó la incorporación de una modalidad de imagen secundaria para eventuales estudios *in vivo*. Se sintetizó una construcción de fármaco conector con Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-D-Tyr-aminopropilo-dMG incorporando un residuo de D-tirosina con el componente de fármaco para unir un radiomarcador (compuestos **23** y **24**). Se preparó el NDC punto C-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-D-Tyr-APdMG, y se radioiodó con éxito con <sup>131</sup>I a >90% de pureza radioquímica (Fig. 8). *Reactivos:*

**[0069]** Se usaron disolventes y reactivos adquiridos de fuentes comerciales sin purificación adicional. Se obtuvieron acetonitrilo, éter dietílico, dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, hexanos, hexafluoroisopropanol (HFIP), metanol, cloruro de metileno (DCM) y ácido trifluoroacético (TFA) de Fisher. Dimetilsulfóxido (DMSO), diisopropiletilamina (DIEA), trietilamina (TEA), carbonato de potasio, bromuro de N-(terc-butiloxycarbonilo)-aminopropilo, (3-aminopropilo) trietoxisilano (APTES), (3-mercaptopropilo)trimetoxisilano, trimetametilfosfato (TMOS), tripsina bovina, y se compraron de Sigma-Aldrich. O-Des-morfolinopropilo gefitinib se obtuvo de Toronto Research Chemicals (TRC). Se adquirió 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-ilo)-hexafluorofosfato de 1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) de Genescript. Las resinas de clorotritilo y los aminoácidos protegidos (Fmoc-Arg-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Phe-OH) se obtuvieron de EMD Chemicals. Fmoc-N-dPEG<sub>2</sub>OH, Mmt-S-dPEG<sub>8</sub>-OH, mal-dPEG<sub>2</sub>-NHS se compraron de Quanta Biosciences. Se obtuvieron Cy5 maleimida y Superdex 200 (grado de preparación) de GE Life Sciences. DMSO-*d* y CDCl<sub>3</sub> fueron adquiridos de Cambridge Isotopes. La síntesis en fase sólida se realizó en jeringas de polipropileno con frita de Torviq. Sílice, placas de TLC, 4 g, 12 g, 24 g y 40 g de cartuchos de fase normal RediSep Rf se obtuvieron de Teledyne ISCO.

#### *Cromatografía Flash:*

**[0070]** Las purificaciones en fase normal (gel de sílice) se realizaron en un Teledyne ISCO CombiFlash Rf utilizando cartuchos de 4 g, 12 g, 24 g y 40 g.

#### *HPLC analítica:*

**[0071]** Las muestras se procesaron en un sistema HPLC Alliance de Waters o un sistema LCMS Autopure (2767 Sample Manager, 2996 Photodiode Array Detector, 2420 ELS Detector, Micromass ZQ, 2525 Binary Gradient Module, Column Fluidics Organizer, 515 HPLC Pump, Pump Control Module II) utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo al 5-95% en agua (TFA al 0,5%) durante 10 minutos a 1,2 ml/min, en una columna analítica XBridge de fase inversa C4 o C18 de 4.6x50 mm (Waters). Las muestras se analizaron a 348 nm o 650 nm.

#### *HPLC preparativa:*

**[0072]** Las muestras se purificaron en un sistema de preparación de aguas (2996 Photodiode Array Detector, 2545 Binary Gradient Module) o Autopure LCMS System usando un gradiente lineal de acetonitrilo al 5-95% en agua (0,5% TFA) durante 30 minutos a 20 mL/min en una columna preparativa XBridge de fase inversa C18 de 19x150 mm (Waters). Las muestras se analizaron a 220 o 348 nm.

#### *Resonancia magnética nuclear (RMN);*

**[0073]** Los datos de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN se obtuvieron en un Bruker Ultrashield 500 Plus.

#### *Ensayos de liberación de drogas con tripsina:*

**[0074]** Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 25 mM (pH 7,2) a 37°C, con 25 µM de NDC (p. ej., **6** o **7**) o fármaco enlazador libre (p. ej., **3**, **4** o **5**) y tripsina 200 nM. Para el análisis, porciones de 70 µL se eliminaron y se apagaron con ácido (HCl) en puntos de tiempo especificados (por ejemplo, 5, 15, 30, 60, 120 minutos o más) y luego se ejecutaron en HPLC/LCMS. Los NDC se almacenaron en agua a 4°C. Las reservas de tripsina se prepararon de la siguiente manera: se disolvió 1 mg de tripsina en 1 ml de agua, se dividió en alícuotas, luego se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C durante hasta cuatro semanas. La actividad de la enzima se probó antes del ensayo de liberación del fármaco usando el sustrato Z-Arg-Arg-para-nitro-anilina. El % de fármaco libre (Figs. 3 y S3) es la cantidad de fármaco libre dividida por la cantidad inicial de fármaco cargado para el constructor enlazador-fármaco o NDC. La cantidad de fármaco libre se determina por el área del pico de HPLC correspondiente al fármaco

liberado a 348 nm. La cantidad de fármaco cargado es el área del pico de HPLC, a 348 nm, para la construcción del enlazador-fármaco o NDC antes del tratamiento enzimático. Al tener el punto C'-(Cy5)-PEG-mal una absorbancia de fondo a 348 nm, es necesaria una sustracción de fondo para el NDC. Todos los tampones y soluciones se prepararon con agua ultrapura (resistividad de 18 MΩ-cm).

#### Ensayos de liberación del fármaco con catepsina B:

**[0075]** Los ensayos se realizaron en tampón de acetato de sodio 25 mM (pH 5,0) a 37°C, con NDC 25 μM (p. ej., **6** o **7**) o fármaco enlazador libre (p. ej., **3**, **4**, o **5**) y 200 nM de catepsina B. No se usó DTT para este ensayo. Para el análisis, 70 μL, las porciones se eliminaron y se apagaron con ácido (HCl) en puntos de tiempo especificados (por ejemplo, 5, 15, 30, 60, 120 minutos o más) y luego se ejecutaron en HPLC/LCMS. Los NDC se almacenaron en agua a 4°C. Las reservas de catepsina B se prepararon de la siguiente manera: se disolvió 1 mg de catepsina B en 1 ml de acetato de sodio 50 mM y EDTA 2,5 mM, se dividieron en alícuotas, luego se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C durante varias semanas. La actividad de la enzima se probó antes del ensayo de liberación del fármaco usando el sustrato Z-Arg-Arg-para-nitro-anilina. El % de fármaco libre (Figs. 4A, 4B, 6A y 6B) es la cantidad de fármaco libre dividida por la cantidad inicial de fármaco cargada para el constructor enlazador-fármaco o NDC, como se describe en el párrafo anterior. Todos los tampones y soluciones se prepararon con agua ultrapura (resistividad de 18 MΩ-cm).

#### Ensayos de estabilidad de NDC:

**[0076]** Los ensayos se realizaron en tampón de acetato de sodio 25 mM (pH 5,0) o tampón de fosfato 50 mM (pH 7,2) con NDC 7,5 μM (por ejemplo, **6** o **7**) y se incubaron a 37°C durante hasta 48 horas. También se evaluó glutatión 10 mM (reducido) en tampón fosfato (pH 7,2). 20 μL, luego se analizaron alícuotas por HPLC. Para un experimento, después de que las células H1650 se trataron con NDC 10 μM (ver el ensayo de fosfoEGFR a continuación) en DEM libre de suero durante 18 horas, los medios se recuperaron y analizaron por HPLC.

#### Ensayo de fosfoEGFR con células H1650:

**[0077]** Se sembraron células H1650 (1,5 millones de células) en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio FBS DEM al 10% y se cultivaron durante 24 horas. Las células se lavaron con 1 ml de medio DEM sin suero, luego se incubaron con gefitinib o NDC a las concentraciones indicadas durante la noche (18 h). Las células se trataron luego con 50 ng/ml de EGF durante 5 minutos, luego se lavaron con 1 ml de PBS. Se añadió tripsina (0,5 ml, 0,25%) a cada pocillo, y se incubó hasta que las células se separaron (~ 5 min). Se añadió 1 ml de medio FBS DEM al 10% a los pocillos, y las células se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml que contenían 10 ml de medio FBS DEM al 10%. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Los sedimentos celulares se lavaron con 1 ml de PBS frío, se transfirieron a tubos de 1,5 ml y se centrifugaron. PBS se decantó y 70 μL de RIPA (que contiene inhibidores de proteasa y fosfatasa) se añadió al sedimento, se tituló y se incubó durante 10 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron a la velocidad máxima durante 10 minutos a 4°C. El lisado se transfirió a nuevos tubos de 1,5 ml y se almacenó a -80°C. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de Bradford. Las transferencias Western se ejecutaron en un aparato Life Technologies, utilizando geles de tris-glicina Novex al 8% (pocillos de 1,5 mm x 15), tampón de ejecución SDS de tris-glicina, tampón de transferencia NuPAGE, Tween-20 al 0,1% en tampón de lavado TBS 1x, y 5% de leche en el tampón de lavado como tampón de bloqueo. Los anticuerpos primarios se aplicaron de la siguiente manera: EGFR antifosforilado (pEGFR, Tyr<sup>1068</sup>) (dilución 1:1000; señalización celular), anti-EGFR (D38B1) (dilución 1:5000; señalización celular), clon monoclonal antiactina AC-15 (dilución 1:5000; Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios aplicados fueron IgG-HRP de cabra anti-ratón (dilución 1:10000; Santa Cruz Biotechnology) e IgG-HRP de cabra anti-conejo (dilución 1:5000; Santa Cruz Biotechnology).

#### Preparación de O-des-Morfolino-gefitinib, dMG (**8**, en la Fig. 12 (Esquema 3)):

**[0078]** El compuesto se obtuvo comercialmente.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.69 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (dd, J = 6.9, 2.7 Hz, 1H), 7.84 (ddd, J = 9.1, 4.4, 2.7 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.41 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 3.98 (s, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 155.83, 153.91, 151.89, 146.73, 146.20, 122.74, 121.69, 116.50, 116.33, 109.51, 107.18, 105.25, 55.92. ESI-MS (m/z) para C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClFN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (masa exacta 319,1): [M+H]<sup>+</sup> calc. 320,1, obs. 320,2.

#### Sintetizando N-(terc-butiloxicarbonilo)-aminopropilo-dMG (**9**, en la Fig. 12 (Esquema 3)):

**[0079]** Se disolvieron 500 mg del compuesto **8** en 100 ml de DMF anhidro. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (mg, mmol) se añadió a la solución. La reacción continuó a 60°C durante 16 horas y se verificó por TLC y/o HPLC. El disolvente se eliminó al vacío dejando un aceite marrón, que se purificó rápidamente en un cartucho de fase normal RediSep Rf de 24 g usando un gradiente lineal de DCM a MeOH al 20% en DCM. El producto final se aisló como un sólido blanco (312 mg, 62% de rendimiento). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.57 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 6.8, 2.7 Hz, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.44 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.92 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.17 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.15 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.95 (p, J = 6.5 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H). <sup>13</sup>C-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 156.01, 155.59, 154.39, 152.61, 146.92, 123.40, 122.29, 118.62, 116.54, 116.37, 107.23, 102.59, 77.51, 66.69, 55.84, 37.22, 35.75, 28.95, 28.22. ESI-MS (m/z) para

$C_{23}H_{26}ClF_4O_4$  (masa exacta 476,2):  $[M+H]^+$  *calc.* 477,2, *obs.* 477,3.

*Preparación de Aminopropilo-O-des-morfolino-gefitinib, APdMG (1, en la Fig. 1A y Fig. 12 (Esquema 3)):*

5 **[0080]** El compuesto **9** (100 mg, 0,21 mmol) se trató con 1 ml de TFA: agua (9:1) durante 30 minutos. El TFA:agua se eliminó al vacío, dejando un aceite amarillo claro. El aceite se lavó con éter dietílico, luego se disolvió en una solución de agua: acetonitrilo (1:1), se congeló y se liofilizó. Se obtuvo un sólido tostado (sal de TFA, 98 mg, 95% de rendimiento).

10  $^1H$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10,73 (s, 1H), 8,80 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,05 - 8,00 (m, 1H), 7,88 (s, 3H), 7,72 (ddd, J = 9,0, 4,3, 2,6 Hz, 1H), 7,54 (t, J = 9,0 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 4,27 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 4,00 (s, 3H), 3,04 (p, J = 6,7, 6,3 Hz, 2H), 2,13 (dt, J = 12,2, 6,0 Hz, 2H).  $^{13}C$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  158,02, 148,80, 116,96, 116,79, 107,60, 103,66, 66,17, 56,42, 36,39, 26,59. ESI-MS (*m/z*) para  $C_{18}H_{18}ClFN_4O_2$  (masa exacta 376,1):  $[M+H]^+$  *calc.* 377,1, *obs.* 377,2.

15 *Preparación de 9-fluorenilmetoxicarbonilo-N-amido-dPEG<sub>2</sub>-aminopropilo-dMG, Fmoc-dPEG<sub>2</sub>APdMG (10, en la Fig. 13 (Esquema 4)):*

**[0081]** Se preparó una solución que contenía dPEG<sub>2</sub>APdMG **2** (25 mg, 0,05 mmol, sal de TFA) y Fmoc-N-amido-dPEG<sub>2</sub>-COOH (20 mg, 0,05 mmol) en DMF (500  $\mu$ L). Se añadió DIEA (19 mg, 0,15 mmol, 26  $\mu$ L) seguido de una solución de HATU (19 mg, 0,05 mmol) en DMF (100  $\mu$ L). La reacción continuó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se determinó completa por LCMS. El volumen se redujo al vacío y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo y metanol al 10% en acetato de etilo. Se recogieron las fracciones, se agruparon y se eliminó el disolvente a vacío. El producto aislado era un sólido blanco (84% de rendimiento).

25  $^1H$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  9,55 (d, J = 10,7 Hz, 1H), 8,51 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 8,18 - 8,07 (m, 1H), 7,96 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 7,87 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,83 - 7,76 (m, 2H), 7,67 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,49 - 7,36 (m, 3H), 7,31 (td, J = 7,5, 1,2 Hz, 3H), 7,21 (s, 1H), 4,28 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 4,24 - 4,10 (m, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,60 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,46 (s, 4H), 3,36 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,27 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 3,10 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 2,32 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 1,97 (p, J = 6,5 Hz, 2H).  $^{13}C$ -RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170,08, 143,85, 127,54, 126,98, 125,10, 120,05, 102,60, 69,42, 69,04, 66,78, 66,58, 55,87, 46,69, 40,01, 39,94, 39,85, 39,77, 39,68, 39,60, 39,51, 39,43, 39,35, 39,25, 39,18, 39,07, 39,01, 36,16, 35,69, 28,67, 0,08. ESI-MS (*m/z*) para  $C_{40}H_{41}ClFN_5O_7$  (masa exacta 757,27):  $[M+H]^+$  *calc.* 758,3, *obs.* 758,4.

*Preparación de Amino-dPEG<sub>2</sub>-aminopropilo-dMG, dPEG<sub>2</sub>APdMG (2, en la Fig. 1A y Fig. 13 (Esquema 4)):*

35 **[0082]** El compuesto **10** (10 mg, 0,013 mmol) se disolvió en piperidina al 30% en DMF (1 ml) y se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó al vacío, se disolvió en agua/acetonitrilo y se purificó por HPLC de fase inversa (C18). El producto se recuperó como un polvo blanco (7 mg, 80% de rendimiento).

40  $^1H$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10,66 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,05 - 7,97 (m, 3H), 7,80 (s, 3H), 7,72 (ddd, J = 9,0, 4,3, 2,6 Hz, 1H), 7,54 (t, J = 9,1 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 4,20 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 4,00 (s, 3H), 3,65 - 3,48 (m, 7H), 3,27 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 2,96 (q, J = 5,5 Hz, 2H), 2,34 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 1,98 (t, J = 6,5 Hz, 2H).  $^{13}C$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  116,96, 69,55, 69,29, 66,73, 66,61, 56,38, 38,57, 36,03, 35,63, 28,58. ESI-MS (*m/z*) para  $C_{25}H_{31}ClFN_5O_5$  (masa exacta 535,20):  $[M+H]^+$  *calc.* 536,2, *obs.* 536,3.

*Preparación de Boc-N-amino-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg (Pbf)-OH (11, en la Fig. 14 (Esquema 5)):*

45 **[0083]** La resina de clorotritilo (100 mg, 0,1 mmol, 1 mmol/g) se transfirió a un recipiente de reacción de jeringa sinterizada y se suspendió en 2 ml de DCM anhidro durante 10 minutos. Se dispensó el disolvente y se introdujo una solución de DIEA en DCM anhidro seguido de una solución de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (97,5 mg, 1,5 eq) en DCM anhidro en la jeringa; y agitado durante 40 min. La solución se dispensó y la resina se lavó durante 2 minutos, 2 veces con DCM, luego 2 veces con DMF. Los procedimientos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida se llevaron a cabo para obtener el péptido final. En resumen, las desprotecciones de Fmoc se lograron lavando la resina 2 veces usando piperidina al 30%/DMF (1 mL) durante 10 minutos. Esto fue seguido por lavados con DMF (1 ml), 4 veces durante 2 minutos cada uno. Las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo a temperatura ambiente usando un exceso de 3 eq de aminoácido protegido (en 2 ml de DMF), un exceso de 9 eq de DIEA (120 mg, 0,9 mmol, 160  $\mu$ L, en 1 mL de DMF), un exceso de 3 eq de HATU (mmol, mg,  $\mu$ L, en 2 ml de DMF), se añadió a la jeringa en ese orden y se agitó durante 1 hora. Esto fue seguido por lavados con DMF (1 ml), 4 veces durante 2 minutos cada uno. Se añadió Fmoc-Phe (116 mg), seguido de tres residuos de Fmoc-N-dPEG<sub>2</sub>-OH (120 mg). Una vez completada la secuencia, se utilizaron la desprotección y los lavados finales de Fmoc, anhidrido de BOC (mmol, mg) y DIEA (mmol, mg,  $\mu$ L) en 2 ml de DMF para tapar la amina N-terminal. La resina peptídica se lavó con DMF (1 ml, 2 min, 2x), luego DCM (1 ml, 2 min, 4x). El producto peptídico protegido se separó luego de la resina añadiendo HFIP al 50% en DCM (2 ml) a la jeringa y agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. El péptido bruto se purificó luego por HPLC de fase inversa. ESI-MS (*m/z*) para  $C_{54}H_{86}N_8O_{17}S$  (masa exacta 1150,56):  $[M+H]^+$  *calc.* 1151,6, *obs.* 1151,7.

*Preparación de Boc-N-amido-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg(Pbf)-APdMG (12, en la Fig. 14 (Esquema 5)):*

65 **[0084]** Se preparó una solución que contiene el compuesto **11** (23 mg, 0,02 mmol, 1 eq) y APdMG **1** (9 mg, 0,024 mmol, 1,2 eq) en DMF (1 ml). A esta DIEA (10 mg, 0,08 mmol, 14  $\mu$ L, 4 eq) se agregó seguido de HATU (9 mg, 0,024

mmol, 1,2 eq). La reacción se controló por HPLC y se completó en 30 minutos. El disolvente se eliminó al vacío, luego se resuspendió en DCM. La solución de DCM se lavó con agua 4x, luego se evaporó dejando un aceite tostado. ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{72}H_{102}ClF_{12}O_{18}S$  (masa exacta 1508,68):  $[M+H]^+$  *calc.* 1509,7, *obs.* 1509,7;  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 755,4, *obs.* 755,0.

*Preparación de Boc-N-amido-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg(Pbf)-dPEG<sub>2</sub>APdMG (13, en la Fig. 14 (Esquema 5)):*

**[0085]** Una solución que contiene el compuesto **11** (30 mg, 0,026 mmol, 1 eq) y se preparó dPEG<sub>2</sub>APdMG **2** (18 mg, 0,034 mmol, 1,3 eq) en DMF (1 ml). A esta DIEA (14 mg, 0,1 mmol, 18  $\mu$ L, 4 eq) se agregó seguido de HATU (13 mg, 0,034 mmol, 1,3 eq). La reacción se controló por HPLC y se completó en 30 minutos. El disolvente se eliminó al vacío, luego se resuspendió en DCM. La solución de DCM se lavó con agua 4x, luego se evaporó dejando un aceite tostado. ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{79}H_{115}ClFN_{13}O_{21}S$  (masa exacta 1667,77):  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 834,9, *obs.* 834,7.

*Preparación de H<sub>2</sub>N-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg-APdMG (14, en el Esquema 6):*

**[0086]** Se añadió TF A/agua (9:1, 1 ml) al compuesto **12** (~0,02 mmol de la etapa anterior) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se evaporó, luego se disolvió en ACN/agua, se congeló y se liofilizó, dejando un sólido tostado. El material bruto se purificó por HPLC de fase inversa. El producto final se dejó como un sólido blanco (14 mg). ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{54}H_{78}ClF_{12}O_{13}$  (masa exacta 1156,55):  $[M+H]^+$  *calc.* 1157,6, *obs.* 1157,8;  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 579,3, *obs.* 579,1.

*Preparación de H<sub>2</sub>N-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg-(dPEG<sub>2</sub>)-APdMG (15, en la figura 14 (Esquema 5)):*

**[0087]** Se añadió TFA/agua (9:1, 1 mL) al compuesto **13** (~0,026 mmol del paso anterior) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se evaporó, luego se disolvió en ACN/agua, se congeló y se liofilizó, dejando un sólido tostado. El material bruto se purificó por HPLC de fase inversa. El producto final se dejó como un sólido blanco (24 mg). ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{61}H_{91}ClFN_{13}O_{16}$  (masa exacta 1315,64):  $[M+H]^+$  *calc.* 1316,7, *obs.* 1316,5;  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 658,6, *obs.* 658,5.

*Preparación de S-Acetilo-mercaptoacetamido-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg-APdMG (16, en la Fig. 14 (Esquema 5)):*

**[0088]** Se preparó una solución que contenía el compuesto **14** (5 mg, 0,004 mmol, 1 eq) y DIEA (1,5 mg, 0,012 mmol, 2  $\mu$ L, 3 eq) en DMF (200  $\mu$ L). Luego se añadió a la solución SAMA-OPfp (2 mg, 0,006 mmol, 1,5 eq) en DMF (100  $\mu$ L) y se dejó reaccionar durante 1 hora. El disolvente se eliminó al vacío y luego se purificó por HPLC de fase inversa. Se recuperaron 3 mg de un sólido blanco. ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{61}H_{91}ClFN_{13}O_{16}$  (masa exacta 1315,64):  $[M+H]^+$  *calc.* 1316,7, *obs.* 1316,5;  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 658,6, *obs.* 658,5.

*Preparación de S-Acetilo-mercaptoacetamido-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG (17, en la Fig. 14 (Esquema 5)):*

**[0089]** Se preparó una solución que contenía el compuesto **15** (5 mg, 0,004 mmol, 1 eq) y DIEA (1,5 mg, 0,012 mmol, 2  $\mu$ L, 3 eq) en DMF (200  $\mu$ L). Luego se añadió a la solución SAMA-OPfp (2 mg, 0,006 mmol, 1,5 eq) en DMF (100  $\mu$ L) y se dejó reaccionar durante 1 hora. El disolvente se eliminó al vacío y luego se purificó por HPLC de fase inversa. Se recuperaron 3 mg de un sólido blanco. ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{65}H_{95}ClF_{13}O_{18}S$  (masa exacta 1431,63):  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 716,8, *obs.* 716,7.

*Preparación de Mercaptoacetamido-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg-APdMG, Phe-Arg-APdMG (3, en la Fig. 1B y Fig. 14 (Esquema 5)):*

**[0090]** Este paso se realizó inmediatamente antes de su uso. Se disolvió 1 mg de compuesto **16** en 100  $\mu$ L de agua/MeOH (1:1), a la que se añadieron 2  $\mu$ L, de 1 N NaOH. Después de 15 minutos, se añadieron 2  $\mu$ L de 1 M HCl para neutralizar la solución se usó directamente. ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{56}H_{80}ClF_{12}O_{14}S$  (masa exacta 1230,53):  $[M+H]^+$  *calc.* 1231,5, *obs.* 1231,4;  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 616,3, *obs.* 616,3.

*Preparación de Mercaptoacetamido-(dPEG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG, Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>APdMG (4, en la Fig. 1C y Fig. 14 (Esquema 5)):*

**[0091]** Este paso se realizó inmediatamente antes de su uso. Se disolvió 1 mg de compuesto **17** en 100  $\mu$ L de agua/MeOH (1:1), a la que se añadieron 2  $\mu$ L de 1 N NaOH. Después de 15 minutos, se añadieron 2  $\mu$ L de 1 M HCl para neutralizar. La solución se usó directamente. ESI-MS ( $m/z$ ) para  $C_{63}H_{93}ClFN_{13}O_{17}S$  (masa exacta 1389,62):  $[M+H]^+$  *calc.* 1390,6, *obs.* 1390,5;  $[M+2H]^{2+}$  *calc.* 695,8, *obs.* 695,7.

*Preparación de Fmoc-Lys(Mtt)-PABOH (18, en la Fig. 15 (Esquema 6)):*

**[0092]** Se preparó una solución de Fmoc-Lys (Mtt)-OH (748 mg, 1,2 mmol, 1 eq) y alcohol para-aminobencílico (300 mg, 2,4 mmol, 2 eq) en DMF (5 ml). Se agregó DIEA (465 mg, 3,6 mmol, 630  $\mu$ L, 3 eq) seguido de una solución de HATU (502 mg, 1,3 mmol, 1,1 eq) en DMF (2 mL). La reacción se completó en 30 minutos y según lo determinado por

HPLC/LCMS. El disolvente se eliminó parcialmente al vacío y se extrajo con acetato de etilo/agua. La capa de acetato de etilo se lavó 4 veces con agua, luego se evaporó dando lugar a un sólido naranja. El material bruto se purificó en un cartucho de fase normal RediSep Rf de 40 g usando un gradiente lineal de hexano y acetato de etilo. El producto final se aisló como un sólido blanco (850 mg, 97% de rendimiento).

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,96 (s, 1H), 7,73 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,47 - 7,41 (m, 6H), 7,39 - 7,20 (m, 12H), 7,18 - 7,11 (m, 2H), 7,05 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 5,29 (s, 1H), 4,63 (s, 1H), 4,44 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,11 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 1,88 (s, 1H), 1,58 (s, 5H), 1,51 (s, 1H), 1,38 (s, 2H). <sup>13</sup>C-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 146,36, 143,22, 141,32, 135,70, 128,57, 128,52, 128,49, 127,79, 127,74, 127,12, 126,14, 124,92, 120,16, 120,02, 77,27, 77,02, 76,76, 70,62, 64,92, 60,41, 47,16, 43,30, 30,57, 23,43, 21,07, 20,93, 14,21, 0,01. ESI-MS (*m/z*) para C<sub>48</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (masa exacta 729,36): [M+H]<sup>+</sup> *calc.* 730,4, *obs.* 730,2.

*Preparación de Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABOH (19, en la Fig. 15, (Esquema 6)):*

**[0093]** El grupo Fmoc se eliminó de Fmoc-Lys(Mtt)-PABOH **18** (425 mg, 0,6 mmol, 1 eq) usando 9 ml de piperidina al 30% en DMF durante 10 minutos. El disolvente se eliminó al vacío y el aceite resultante se resuspendió en 10 ml de solución de DMF A de Fmoclis (Mtt)-OH (748 mg, 1,2 mmol, 1 equiv.) y alcohol bencílico de para-amino (300 mg, 2,4 mmol, Se prepararon 2 eq) en DMF (5 ml). Se agregó DIEA (465 mg, 3,6 mmol, 630 μL, 3 eq) seguido de una solución de HATU (502 mg, 1,3 mmol, 1,1 eq) en DMF (2 mL). La reacción se completó en 30 minutos y según lo determinado por HPLC/LCMS. El disolvente se eliminó parcialmente al vacío y se extrajo con acetato de etilo/agua. La capa de acetato de etilo se lavó 4 veces con agua, luego se evaporó dando lugar a un sólido naranja. El material bruto se purificó en un cartucho de fase normal RediSep Rf de 40 g usando un gradiente lineal de hexano y acetato de etilo. El producto final se aisló como un sólido blanco (850 mg, 97% de rendimiento).

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,20 (s, 1H), 7,73 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,50 (s, 2H), 7,48 - 7,34 (m, 8H), 7,34 - 7,20 (m, 1H), 7,20 - 7,07 (m, 7H), 7,04 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 6,28 (s, 1H), 5,22 (s, 1H), 4,62 (s, 2H), 4,43 (dd, J = 10,7, 6,7 Hz, 1H), 4,32 (d, J = 11,5 Hz, 1H), 3,05 (s, 2H), 2,27 (s, 3H), 2,11 - 2,02 (m, 2H), 1,89 (s, 1H), 1,46 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 1,26 (s, 2H). <sup>13</sup>C-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146,35, 141,31, 136,97, 135,70, 129,10, 128,93, 128,57, 128,50, 127,82, 127,74, 127,71, 127,39, 127,12, 126,14, 124,91, 124,84, 120,10, 120,04, 77,28, 77,23, 77,02, 76,77, 70,60, 67,15, 64,96, 54,06, 47,08, 43,35, 31,30, 30,60, 23,52, 20,93. ESI-MS (*m/z*) para C<sub>57</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (masa exacta 876,43): [M+H]<sup>+</sup> *calc.* 877,4, *obs.* 877,3.

*Preparación de Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-APdMG (21, en la Fig. 15 (Esquema 6)):*

**[0094]** El compuesto **19** (420 mg, 0,5 mmol, 1 eq) se disolvió en DCM anhidro (20 ml). Se añadió piridina (216 mg, 2,7 mmol, 5,4 eq), seguido de una solución de cloroformiato de 4-nitrofenilo (180 mg, 0,9 mmol, 1,8 eq) en DCM anhidro. La reacción continuó durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se verificó por HPLC y TLC. El disolvente se eliminó al vacío y luego se purificó en un cartucho de fase normal RediSep Rf de 24 g usando un gradiente lineal de hexano y acetato de etilo. El producto Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP (**20**), se aisló como un sólido amarillo (360 mg, 70% de rendimiento). Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP (50 mg, 0,05 mmol, 1 eq) se disolvió en DCM anhidro (3 ml). Luego se agregó una solución de APdMG **1** (25 mg, 0,05 mmol, sal de TFA, 1 eq) con DIEA (65 mg, 0,5 mmol, 90 μL, 10 eq) en DCM anhidro a Fmoc-Phe-Lys(Mtt)-PABC-pNP. La reacción continuó a temperatura ambiente durante 4 horas, luego se verificó por HPLC y TLC. El disolvente se eliminó al vacío y el material bruto se purificó en un cartucho de fase normal RediSep Rf de 4 g con un gradiente lineal de hexano y acetato de etilo. El producto final se aisló como un sólido amarillo (38 mg, 60% de rendimiento). ESI-MS (*m/z*) para C<sub>76</sub>H<sub>72</sub>ClFN<sub>8</sub>O<sub>8</sub> (masa exacta 1278,51): [M+H]<sup>+</sup> *calc.* 1279,5, *obs.* 1279,4; [M+2H]<sup>2+</sup> *calc.* 640,3, *obs.* 640,3.

*Preparación de Mmt-S-dPEG<sub>8</sub>-Phe-Lys(Mtt)-pABC-dMG (22, en la Fig. 15 (Esquema 6)):*

**[0095]** Se desprotegeron 18 mg del compuesto **21** (0,014 mmol, 1 eq) con 2 ml de piperidina al 30% en DMF. Después de 5 minutos, la reacción se confirmó completa por HPLC/LCMS, y el disolvente se eliminó al vacío. El aceite resultante se disolvió en DMF (0,5 ml), a lo que se añadieron Mmt-S-dPEG<sub>8</sub>-COOH (13 mg, 0,017 mmol, 1,2 eq) y DIEA (9 mg, 0,070 mmol, 13 HL, 5 eq). Se preparó una solución de HATU (6 mg, 0,014 mmol, 1,2 eq) en DMF (200 l) y se añadió a la reacción. Después de 1 hora, la reacción se consideró completa por HPLC/LCMS, y el disolvente se eliminó al vacío. El aceite restante se purificó instantáneamente en un cartucho de fase normal RediSep Rf de 4 g usando un gradiente lineal de DCM a MeOH al 10% en DCM. El producto final se aisló como un sólido blanco (23 mg, 92% de rendimiento). ESI-MS (*m/z*) para C<sub>100</sub>H<sub>114</sub>ClFN<sub>8</sub>O<sub>16</sub>S (masa exacta 1768,77): [M+2H]<sup>2+</sup> *calc.* 885,9, *obs.* 886,0.

*Preparación de HS-dPEG<sub>8</sub>-Phe-Lys-PABC-aminopropilo-dMG (5, en la Fig. 15 (Esquema 6)):*

**[0096]** Se trataron 10 mg del compuesto **22** (5,6 μmol) con 2 ml de TFA al 0,5%/TIS al 5% en DCM durante 2 horas, luego se verificó por HPLC/LCMS para confirmar la desprotección completa. La solución se retiró al vacío y luego se lavó con éter frío, 3x. El sólido blanco se disolvió en agua/acetoneitrilo (1:1), se congeló y se liofilizó. El sólido blanco resultante se usó sin purificación adicional (6 mg, 86% de rendimiento). ESI-MS (*m/z*) para C<sub>60</sub>H<sub>82</sub>ClF<sub>8</sub>O<sub>15</sub>S (masa exacta 1240,53): [M+H]<sup>+</sup> *calc.* 1241,5, *obs.* 1241,6; [M+2H]<sup>2+</sup> *calc.* 621,3, *obs.* 621,3.

*Preparación del punto C'-(Cy5)-PEG-Maleimida:*

**[0097]** Una maleimida y polietilenglicol funcionalizado con éster de NHS (mal-dPEG<sub>12</sub>-NHS) se conjugó con aminosilano (APTES) en DMSO (relación molar mal-PEG-NHS:APTES:DMSO 1:0,9:60). La mezcla de reacción se dejó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 48 horas para generar mal-dPEG funcionalizado con silano (mal-dPEG-APTES). Se hizo reaccionar un Cy5 funcionalizado con maleimida (mal-Cy5) con un tiol-silano (MPTMS) en DMSO (relación molar Cy5:MPTMS:DMOS 1:25:1150). La reacción se dejó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 24 horas para generar un Cy5 funcionalizado con silano (Cy5-MPTMS). TMOS y Cy5-MPTMS fueron luego titulados en una solución de hidróxido de amoníaco (~ pH 8) (relación molar TMOS: Cy5: NH<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>O 1: 0,001: 0,44: 1215). La solución se agitó a 600 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas para formar nanopartículas de sílice encapsuladas Cy5 homogéneas. Luego se añadieron mal-dPEG-APTES y polietilenglicol funcionalizado con silano (PEG-silano, MW alrededor de 500, Gelest) a la solución de síntesis para PEGilato y se funcionalizaron en la superficie las partículas (PEG-silano: TMOS: mal-PEG-APTES 1:2,3:0,006). La solución se agitó a 600 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas seguido de incubación a 80°C durante otras 24 horas sin agitar. La solución se dializó en 2000 ml con agua desionizada durante dos días (10k MWCO), se filtró con filtros de jeringa de 200 nm y finalmente se purificó cromatográficamente (Superdex 200) dando como resultado los puntos mal-C' deseados.

*Preparación de punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-Gly-D-Tyr-APdMG:*

**[0098]** Se usó la misma estrategia sintética global usada para obtener el compuesto **6**. Se sintetizó la construcción del enlazador-fármaco Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-Gly-D-Tyr-APdMG (**23**). (ESI-MS (*m/z*) para C<sub>74</sub>H<sub>105</sub>ClFN<sub>15</sub>O<sub>20</sub>S (*masa exacta* 1609,71): [M+2H]<sup>2+</sup> *calc.* 805,9, *obs.* 805,6). Esta construcción se unió al punto C'-(Cy5)-PEG-mal como se describe para los NDC **6** y **7**.

*Preparación de punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Lys-PABC-Gly-D-Tyr-APdMG:*

**[0099]** Se usó la misma estrategia sintética global usada para obtener el compuesto **7**. Se sintetizó la construcción de enlazador-fármaco Phe-Lys-PABC-Gly-D-Tyr-APdMG (**24**). (ESI-MS (*m/z*) para C<sub>71</sub>H<sub>94</sub>ClFN<sub>10</sub>O<sub>18</sub>S (*masa exacta* 1460,61): [M+H]<sup>+</sup> *calc.* 1461,6, *obs.* 1461,3; [M+2H]<sup>2+</sup> *calc.* 731,3, *obs.* 731,5). Esta construcción se unió al punto C'-(Cy5)-PEG-mal como se describe para los NDC **6** y **7**.

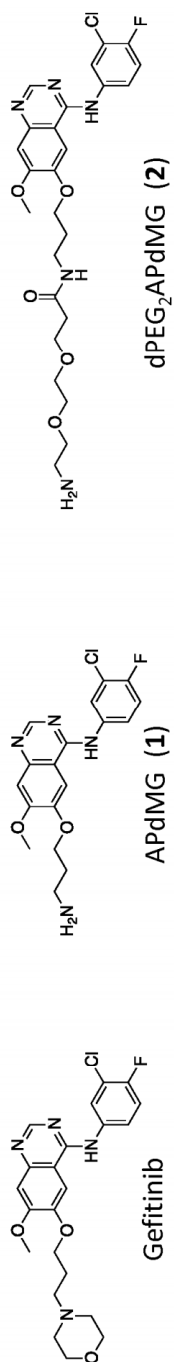
*Preparación de radioyodación de punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-Gly-D-Tyr-aminopropilo-APdMG:*

**[0100]** La radioyodación se realizó en el punto C'-(Cy5)-PEG-Phe-Arg-dPEG<sub>2</sub>-Gly-D-Tyr-APdMG usando protocolos de Iodogen. Las reacciones de hospedaje se purificaron en una columna PD10, luego se analizaron por GPC (Superdex).

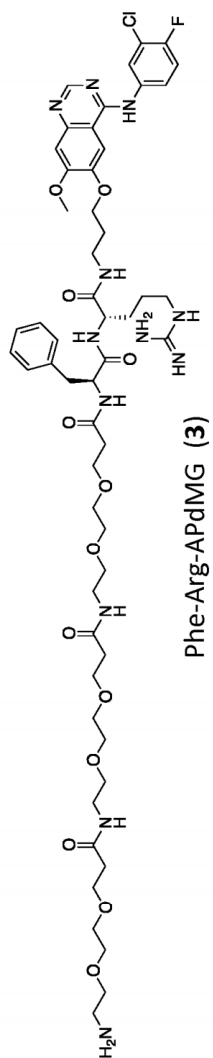
## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de drogas en nanopartículas (DC) que comprende:  
una nanopartícula (por ejemplo, que tiene un diámetro dentro de un rango de 1 nm a 25 nm);  
5 un resto enlazador; y  
un resto de fármaco,  
en donde la nanopartícula está recubierta con un polímero orgánico,  
en donde el polímero orgánico comprende al menos un grupo maleimida sililo-polietilenglicol bifuncionalizado unido a  
al menos un constructo de enlazador-fármaco,  
10 en donde el resto de enlazador comprende uno o más aminoácidos,  
en donde el resto de fármaco y los restos de enlazador forman un constructo de enlazador-fármaco escindible por  
proteasa que está unido covalentemente a la nanopartícula
2. El NDC de la reivindicación 1, en donde los restos de fármaco comprenden dasatinib o gefitinib, incluyendo cualquier  
15 análogo de los mismos.
3. El NDC de la reivindicación 1, en donde la relación media de resto de fármaco a nanopartícula está en el intervalo  
de 1 a 20 aminoácidos.
- 20 4. El NDC de la reivindicación 1, en donde el resto enlazador comprende de 1 a 10 aminoácidos.
5. El NDC de la reivindicación 1, en donde la nanopartícula tiene un diámetro medio de 5 nm a 10 nm.
6. El NDC de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde el resto enlazador comprende (Amino-(espaciador)<sub>x</sub>)<sub>y</sub>-  
25 péptido o (espaciador)<sub>z</sub>-péptido [por ejemplo, dipéptido (por ejemplo, fenilalanina-arginina (Phe-Arg) o fenilalanina-  
lisina (Phe-Lys))]  
en donde el espaciador tiene de 2 a 50 átomos (por ejemplo, en donde el espaciador es PEG),  
en donde x es un número entero de 1 a 5,  
en donde y es un número entero de 1 a 5,  
30 en donde z es un número entero de 5 a 15, y  
en donde el resto enlazador comprende un resto degradable entre el resto enlazador y el resto del fármaco.
7. El NDC de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto enlazador comprende un espaciador entre un  
péptido y el resto del fármaco; y/o,  
35 en donde el espaciador comprende polietilenglicol (PEG), PEG<sub>2</sub>, o *para*-aminobenciloxi carbamato (PABC).
8. El NDC de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un compuesto fluorescente y/o  
comprende también un radiomarcador.
- 40 9. El NDC de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el resto enlazador es capaz de experimentar  
hidrólisis en el extremo C-terminal durante la unión de proteasa, liberando de esta manera el resto del fármaco de la  
nanopartícula.
- 45 10. El NDC de la reivindicación 9, en donde la proteasa comprende una proteasa de serina o proteasa de cisteína.
11. El NDC de cualquier de las reivindicaciones anteriores, en donde el resto de fármaco comprende un inhibidor del  
receptor de tirosina quinasa (RTK).
- 50 12. El NDC de la reivindicación 11, en donde el inhibidor RTK comprende dasatinib o gefitinib, incluyendo cualquier  
análogo del mismo modificado para proporcionar la unión al resto de enlazador sin perturbar la estructura química  
subyacente de un sitio de unión activo del resto de fármaco.
13. El NDC de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además de 1 a 20 restos dirigidos, en  
donde los restos dirigidos se unen a receptores en las células tumorales; y/o, en donde los 1 a 20 restos dirigidos  
55 comprenden ácido arginilglicilaspártico cíclico (cRGD).
14. El NDC de la reivindicación 11, en donde el NDC es un teranóstico.
15. El NDC de la reivindicación 8, en donde el compuesto fluorescente es Cy5,5.
- 60 16. El NDC de la reivindicación 8, en donde el resto del fármaco está unido al radiomarcador.
17. El NDC de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula comprende además un núcleo  
a base de sílice y una cubierta de sílice que rodea al menos una parte del núcleo.
- 65

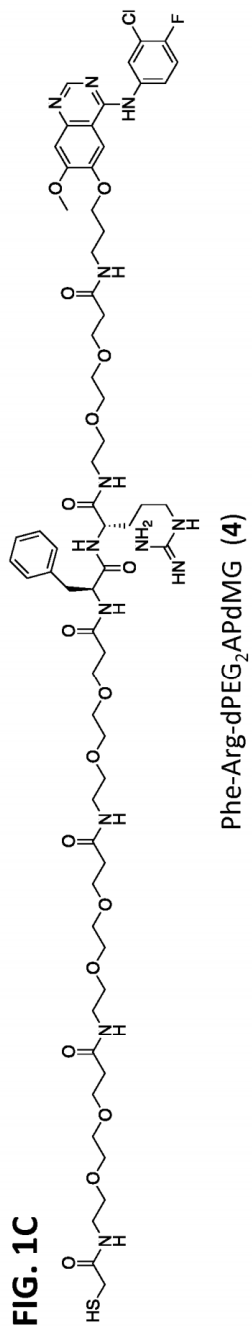
**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



**FIG. 1C**



**FIG. 1D**

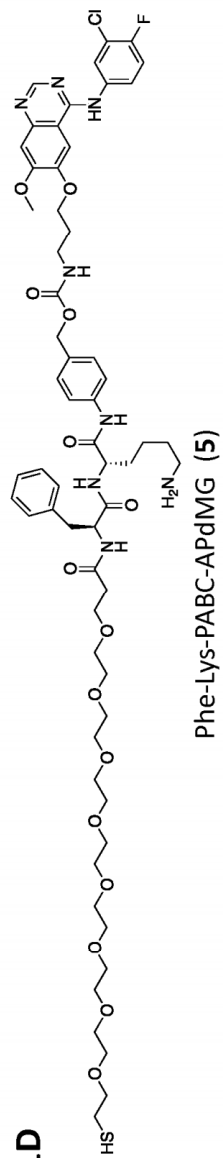




FIG. 2A

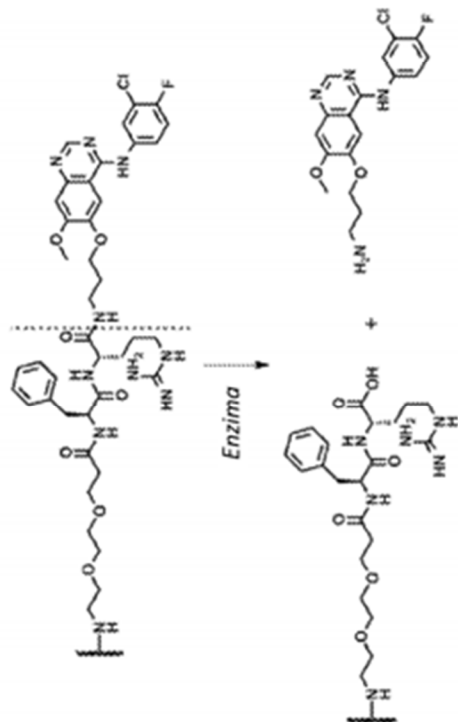


FIG. 2B

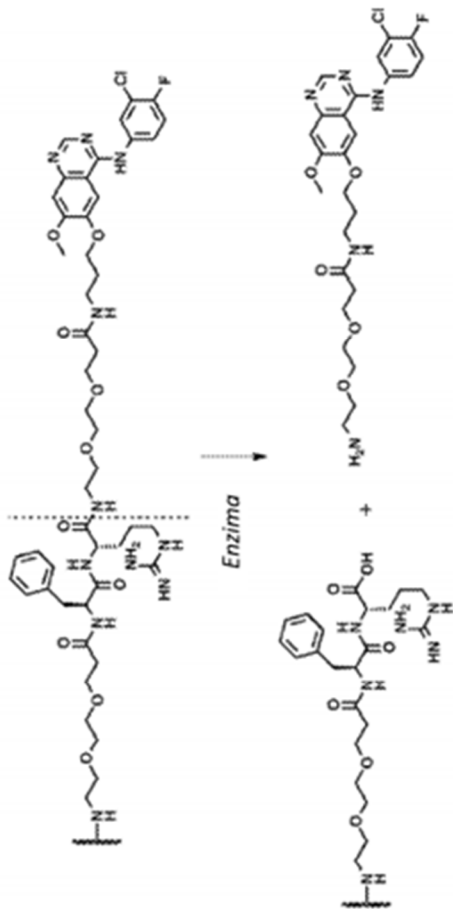


FIG. 2C

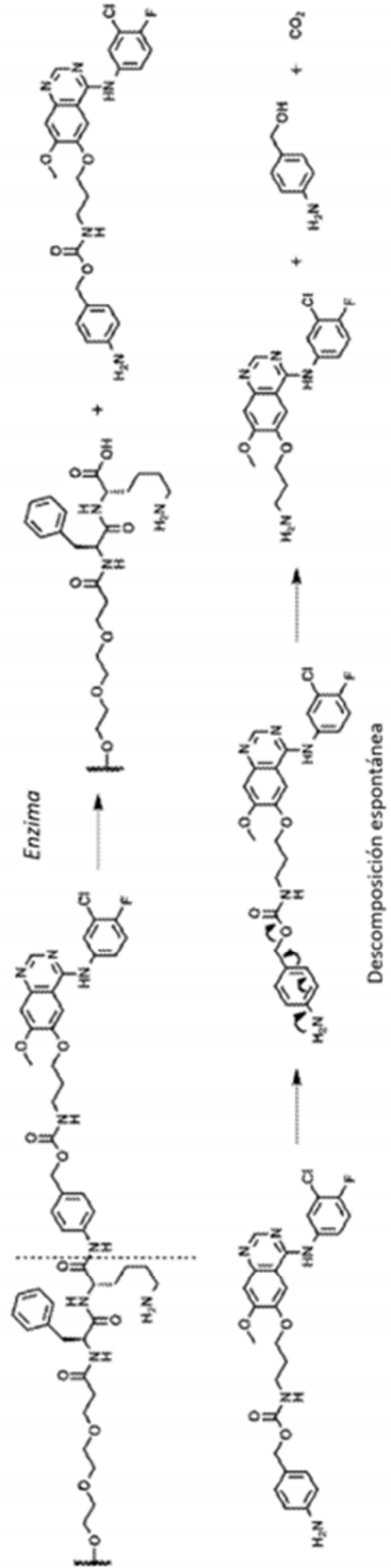
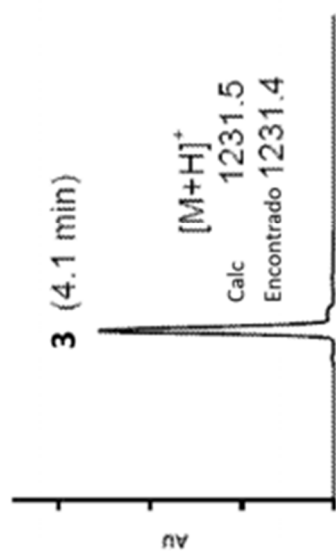


FIG. 3A



+ Tripsina

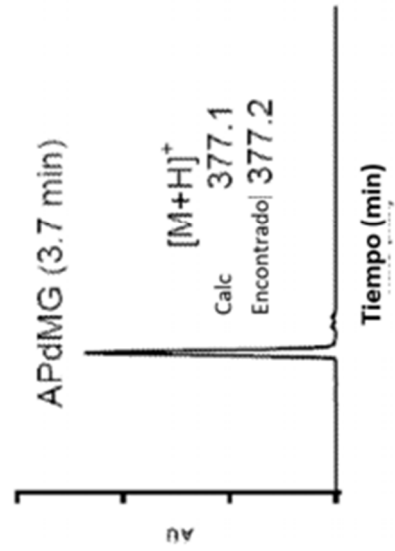
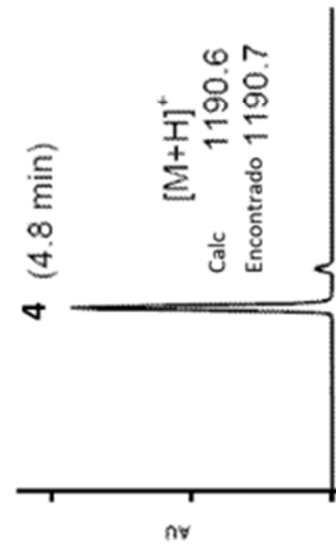


FIG. 3B



+ Tripsina

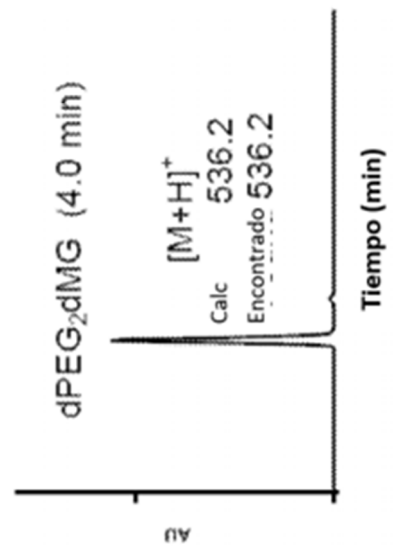
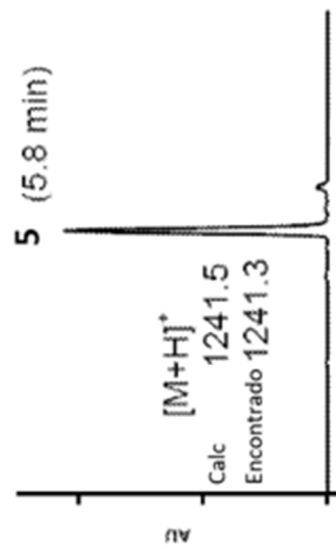


FIG. 3C



+ Tripsina

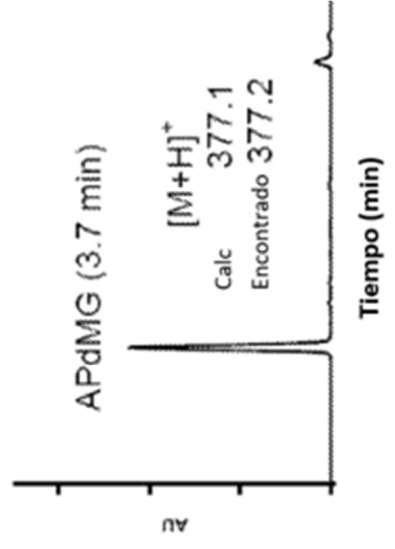


FIG. 4B

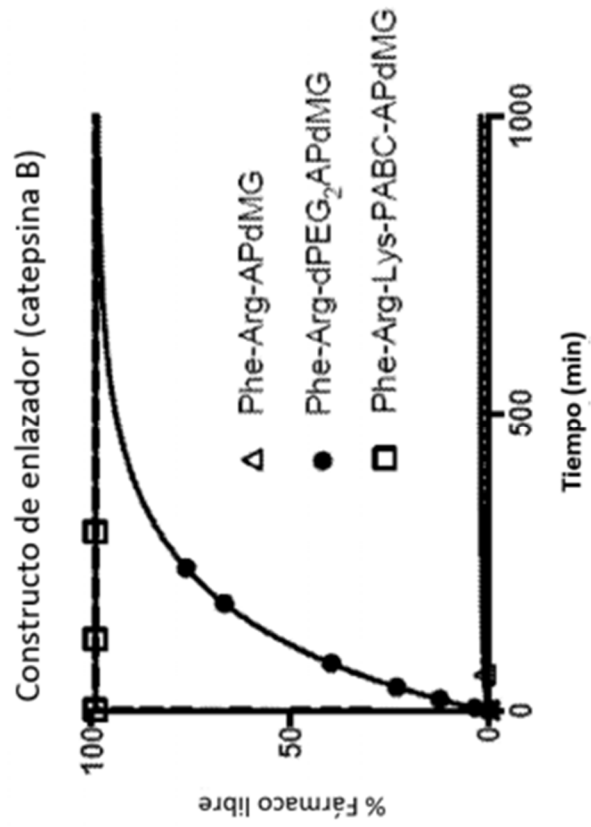


FIG. 4A

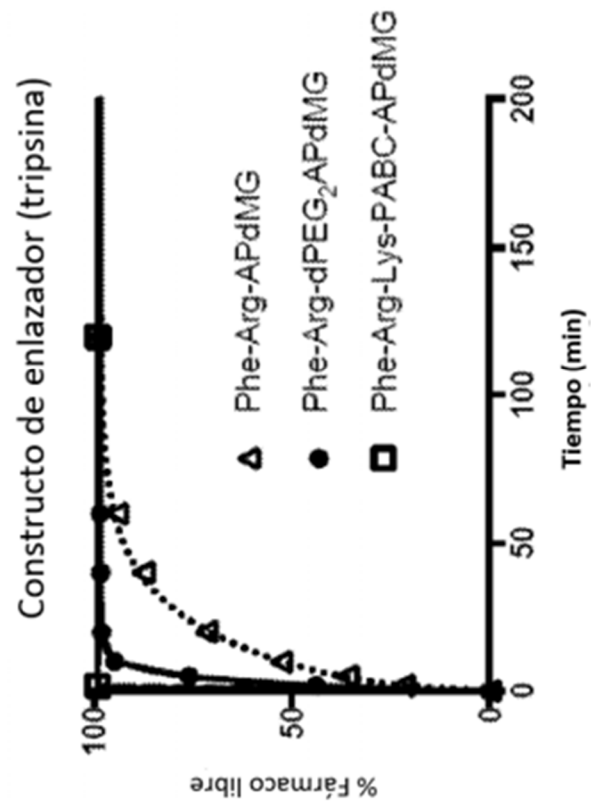


FIG. 5B

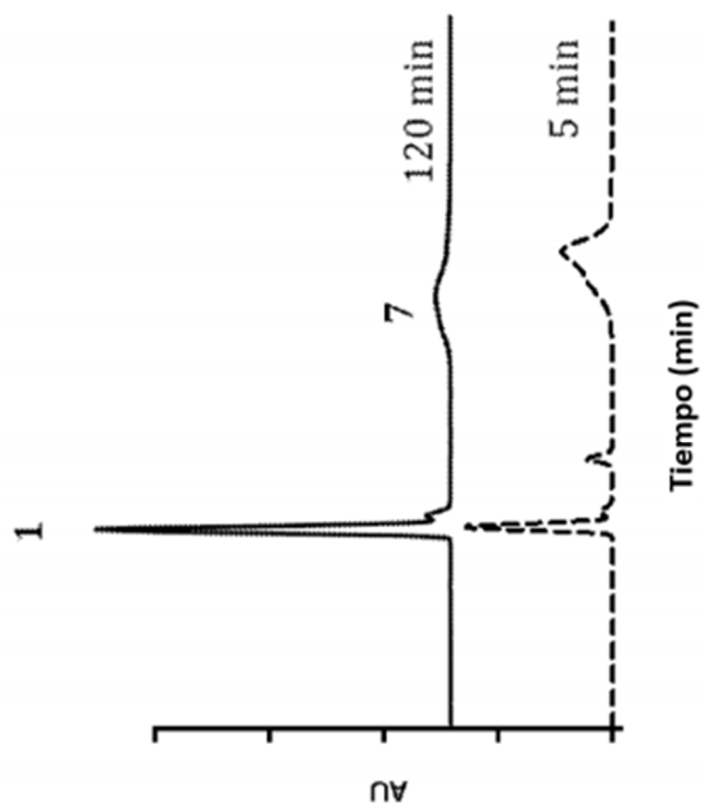


FIG. 5A

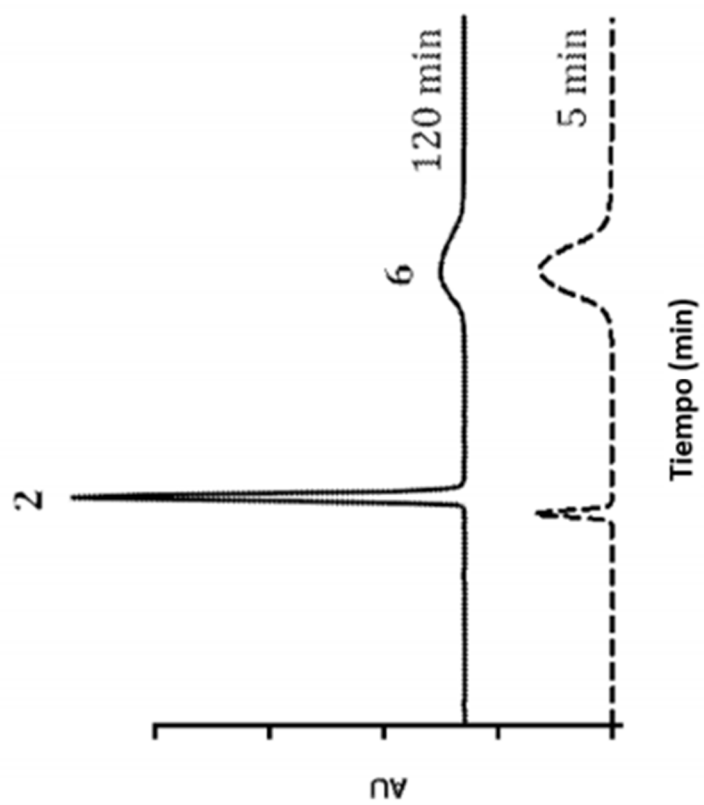


FIG. 6A

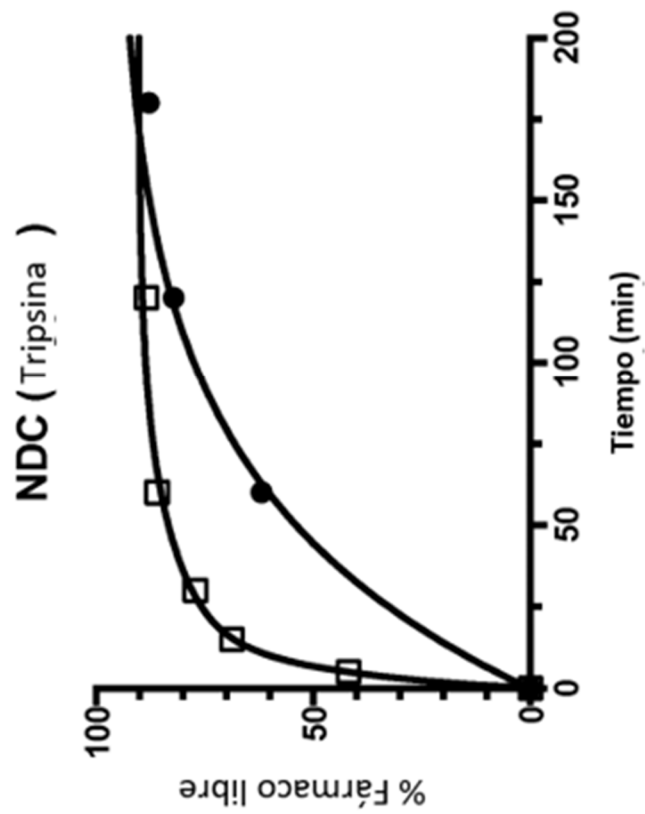


FIG. 6B

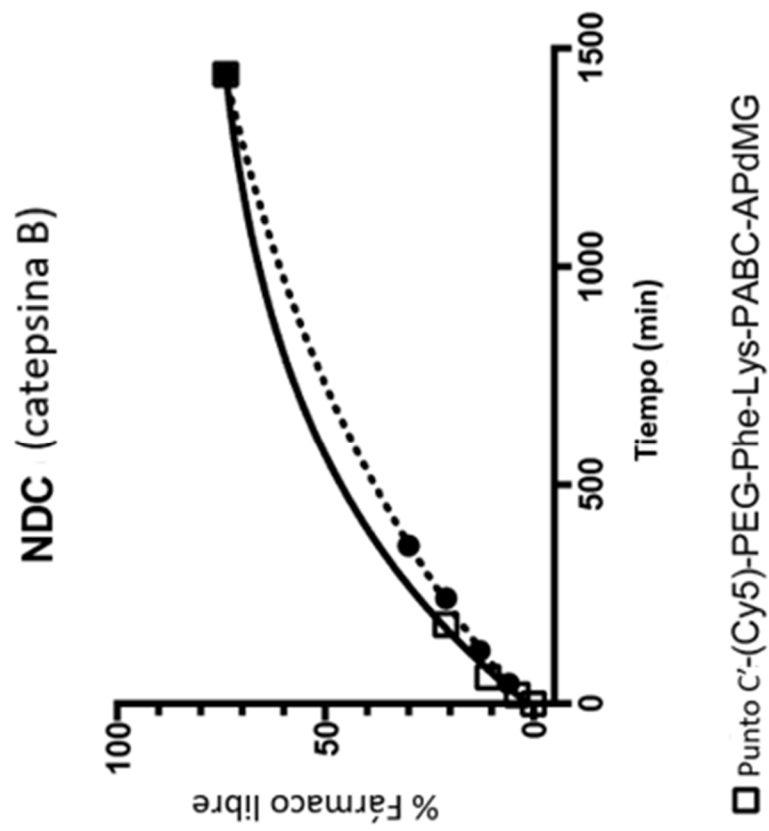


FIG. 7

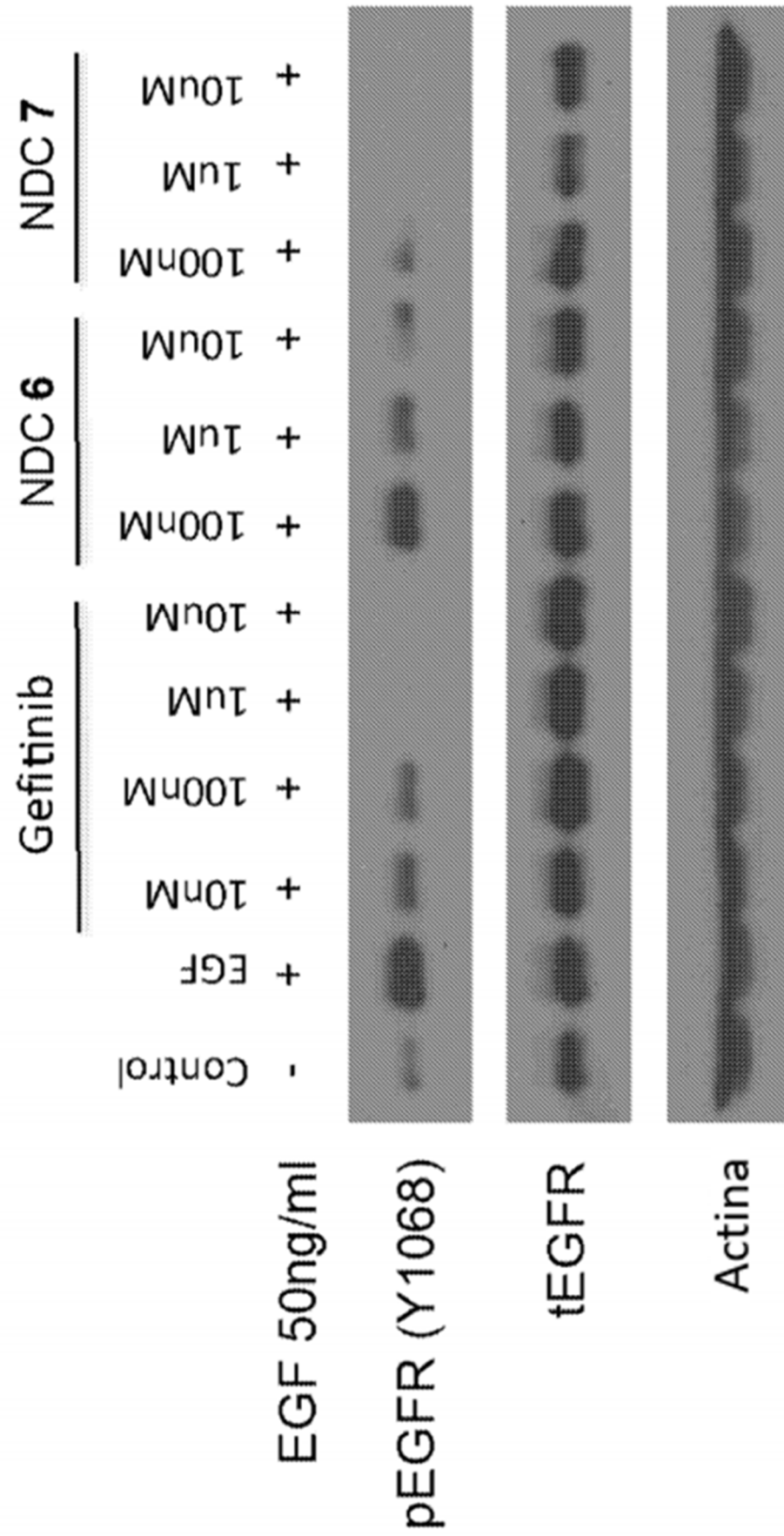


FIG. 8

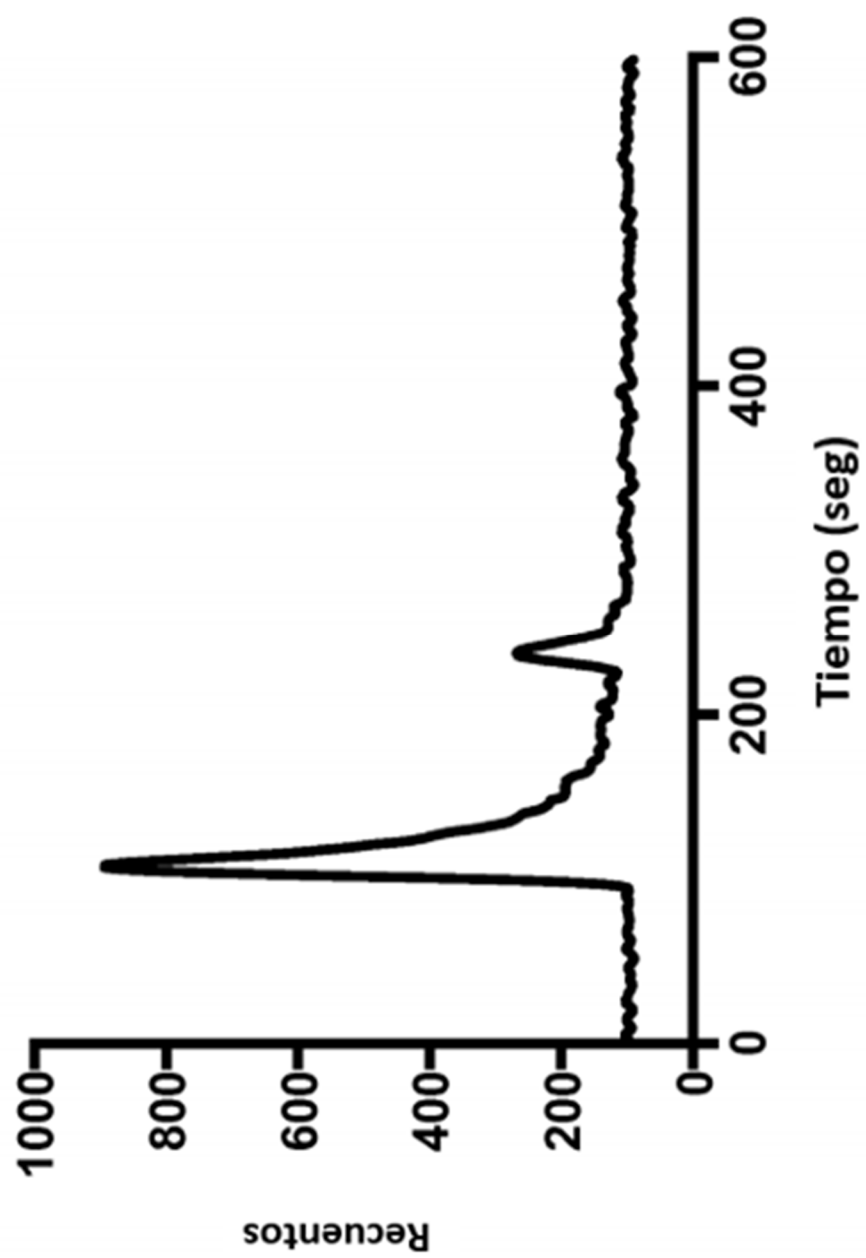


FIG. 9A

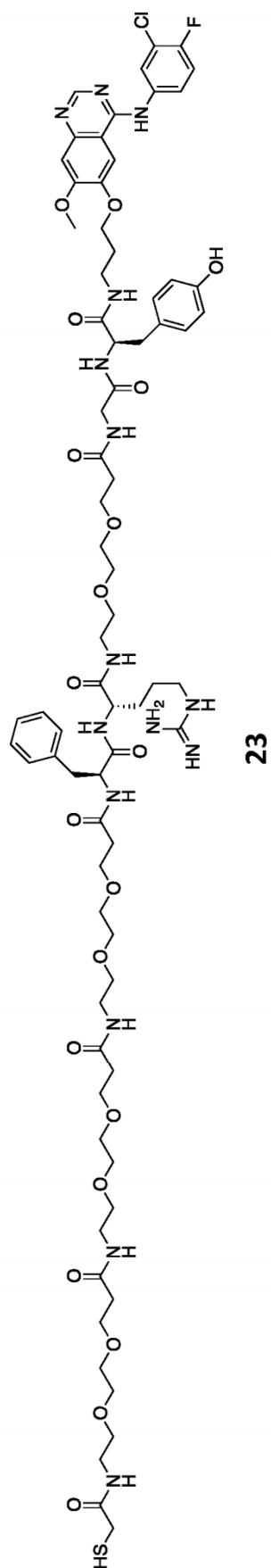


FIG. 9B

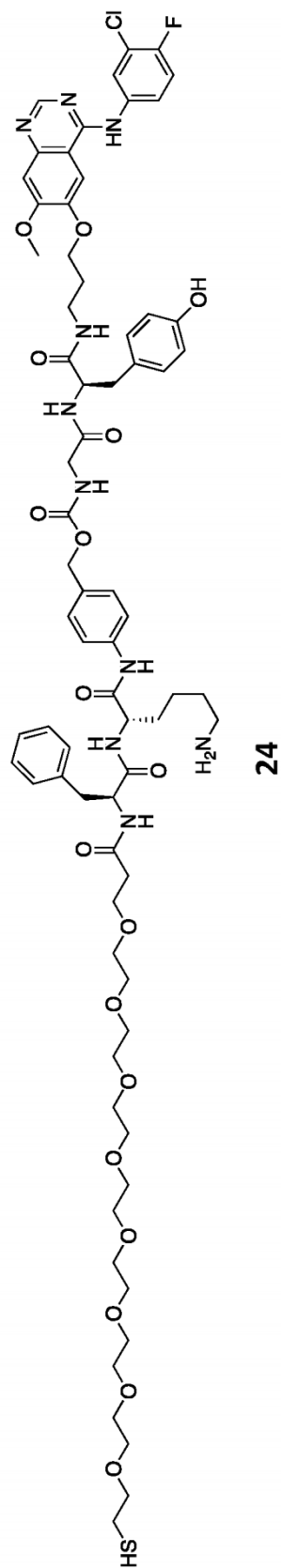
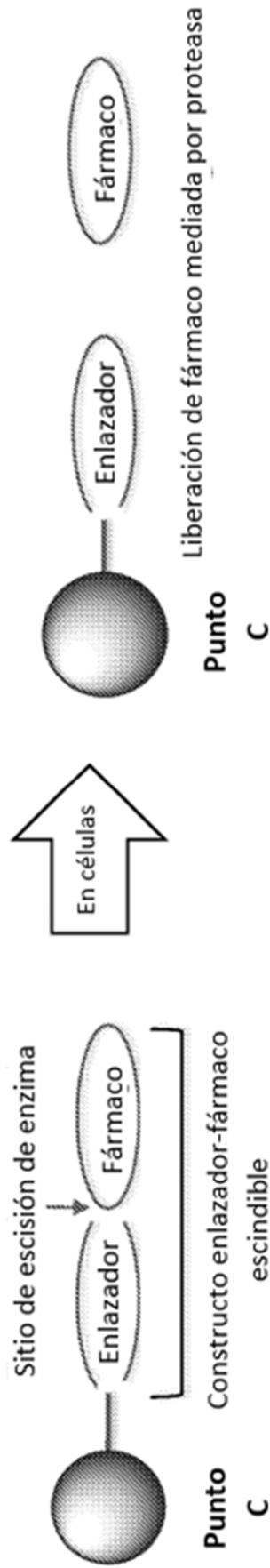


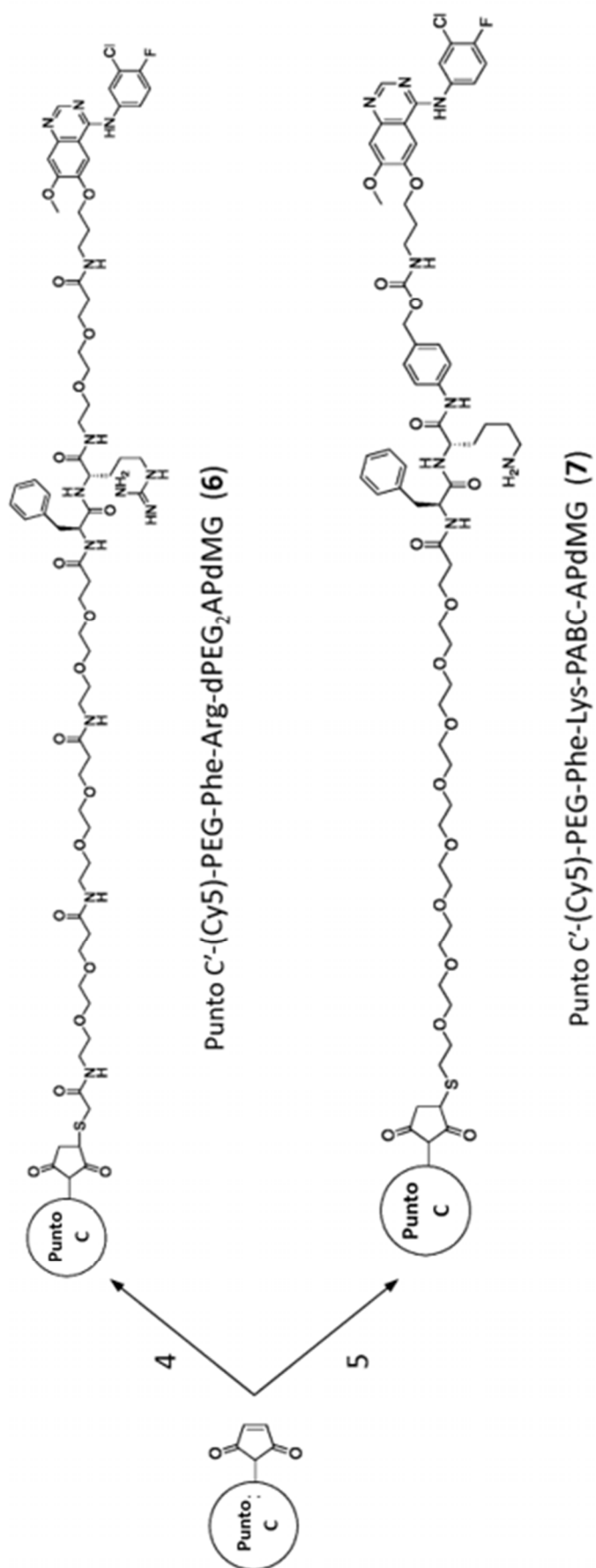


FIG. 10



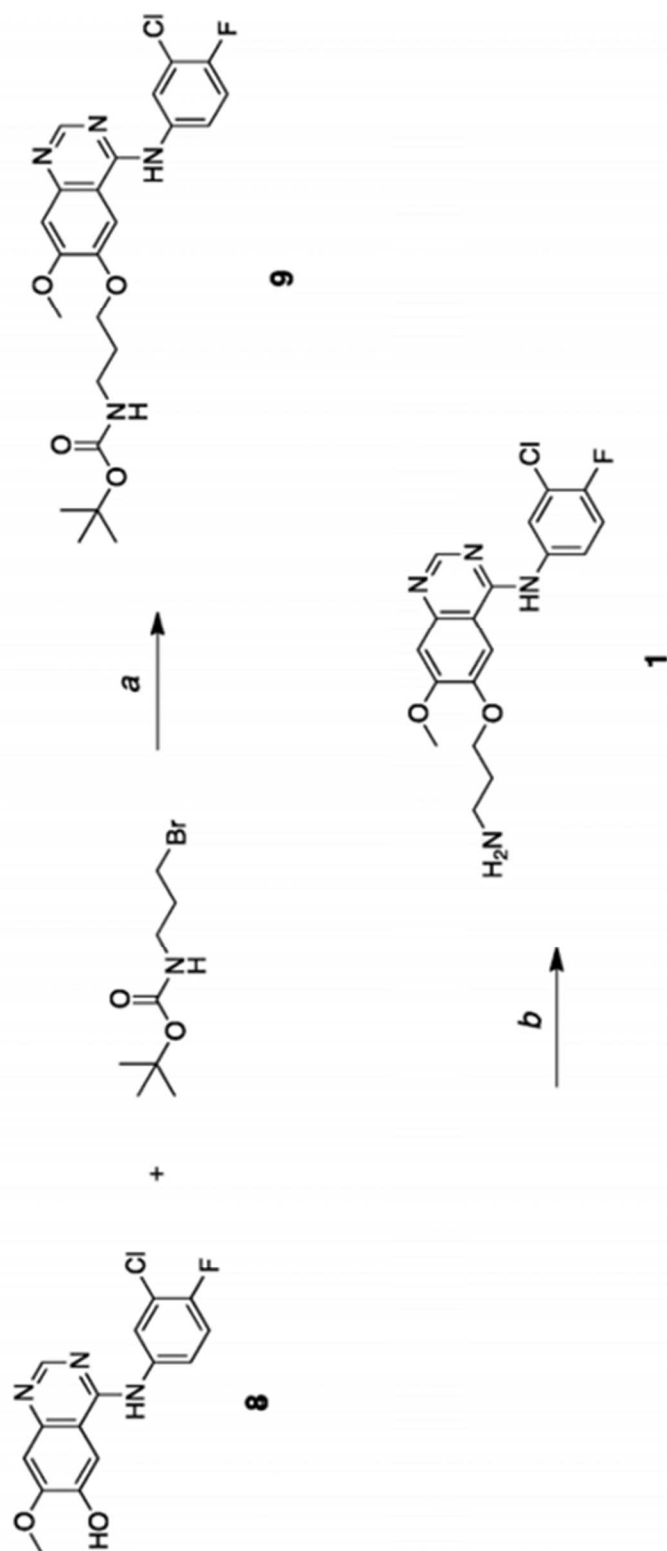
Esquema 1

FIG. 11



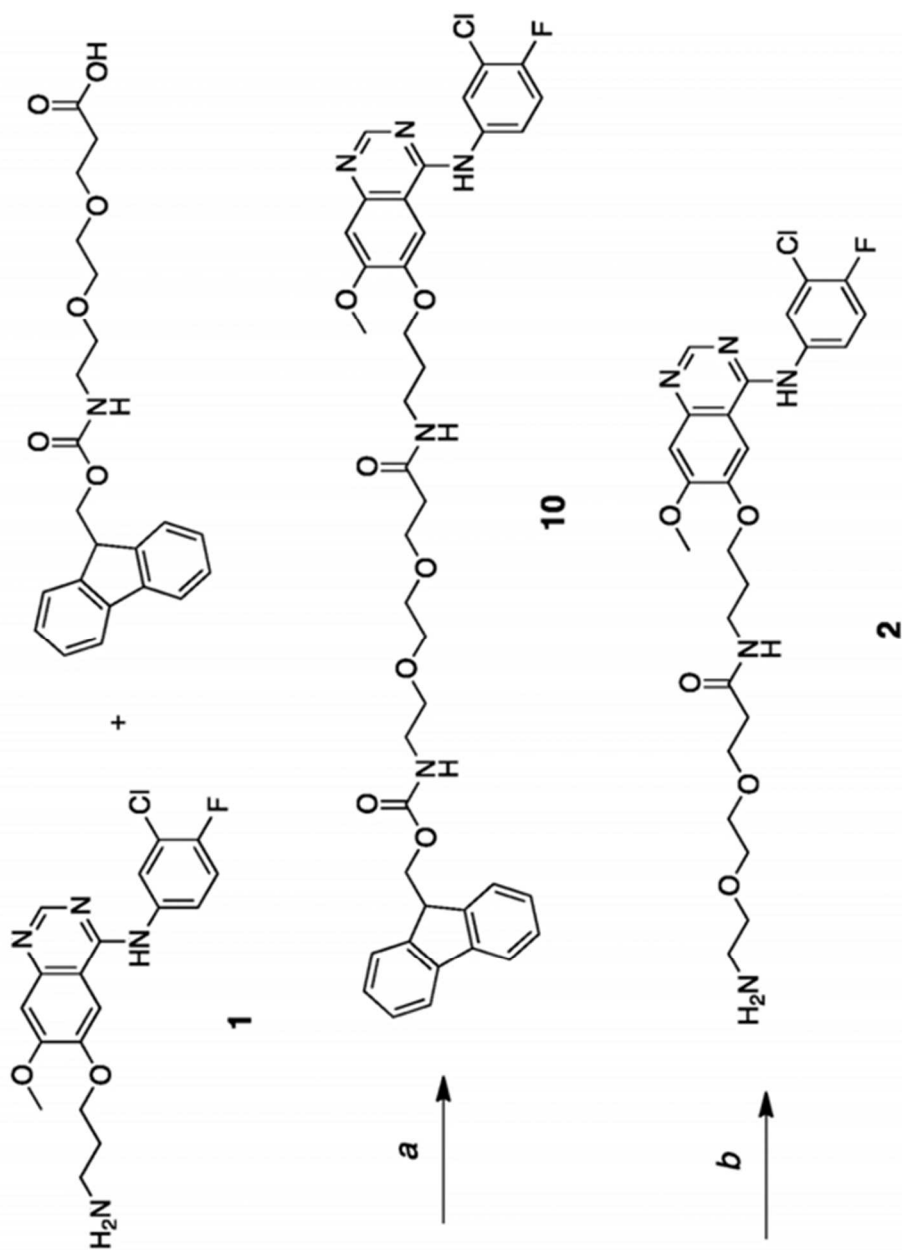
Esquema 2

FIG. 12



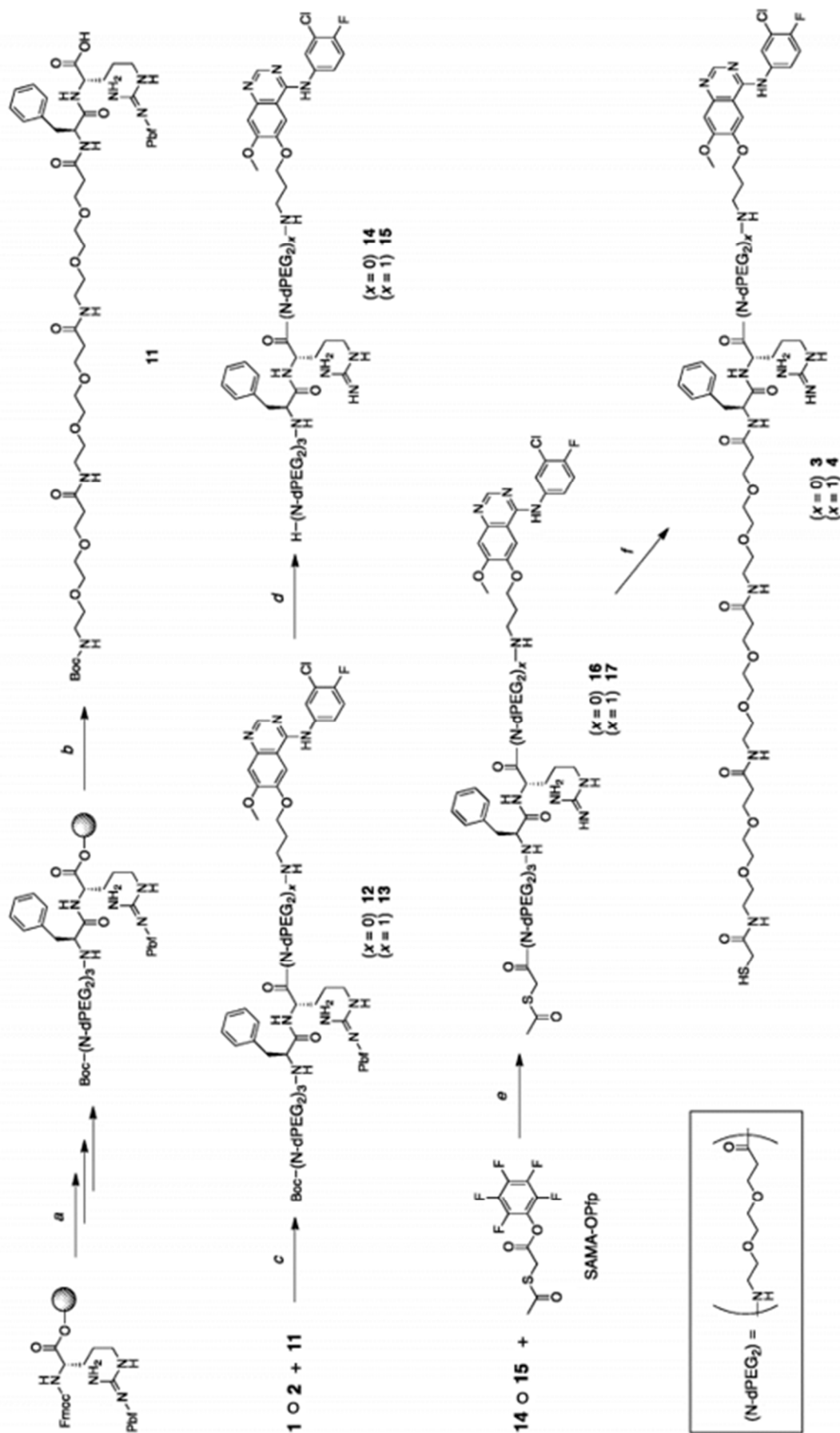
Esquema 3

FIG. 13



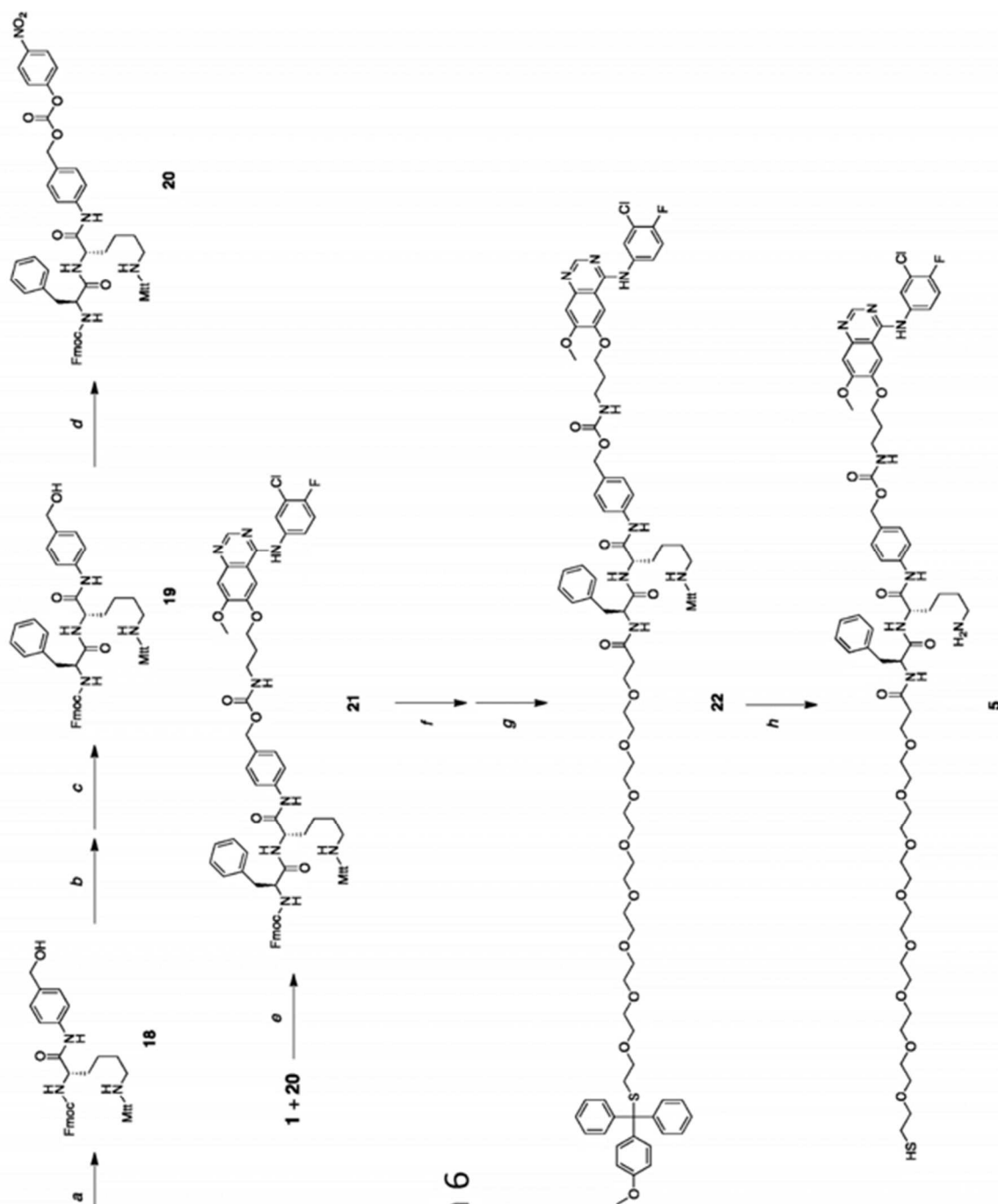
Esquema 4

FIG. 14



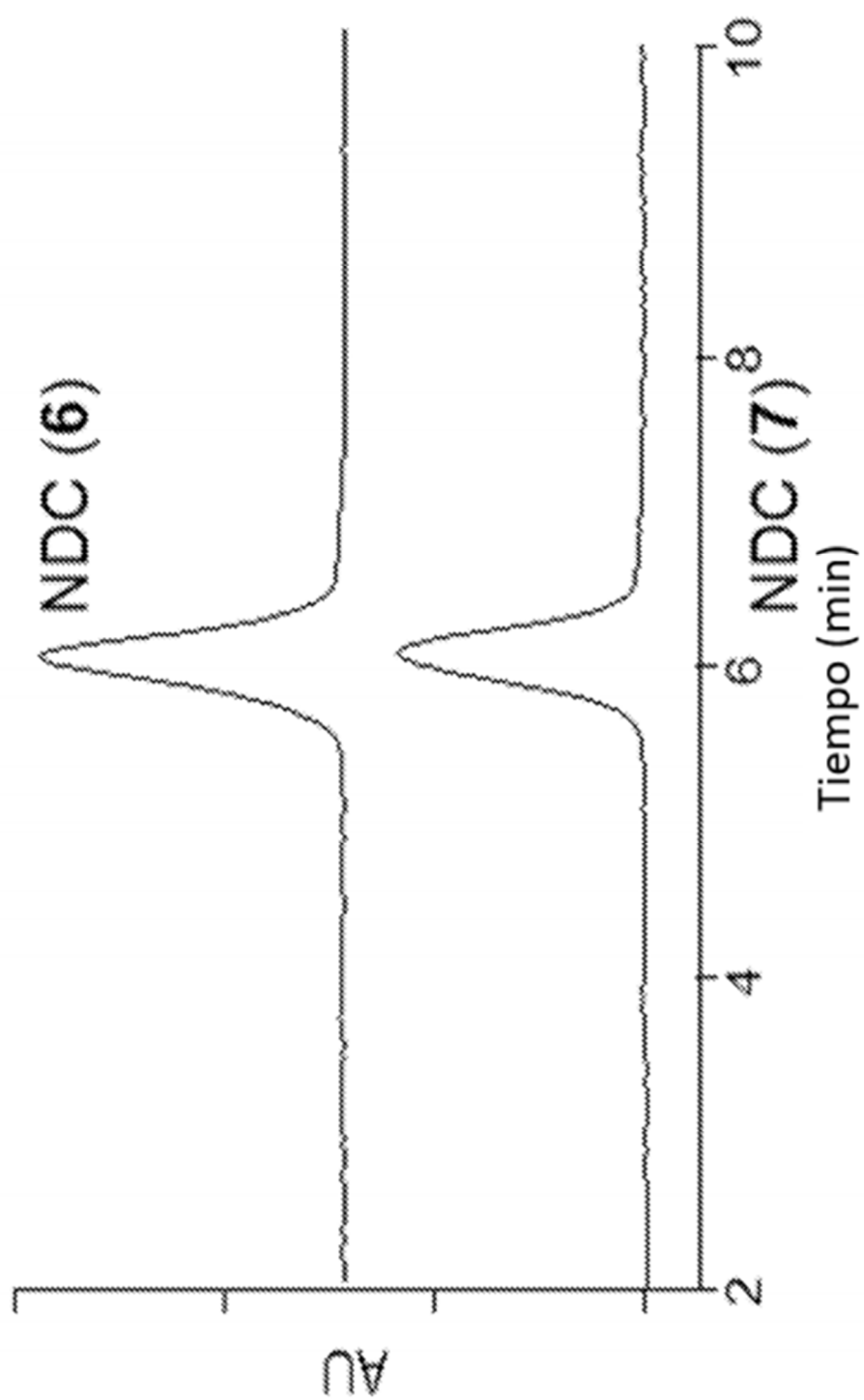
Esquema 5

FIG. 15



Esquema 6

FIG. 16A



**FIG. 16B**

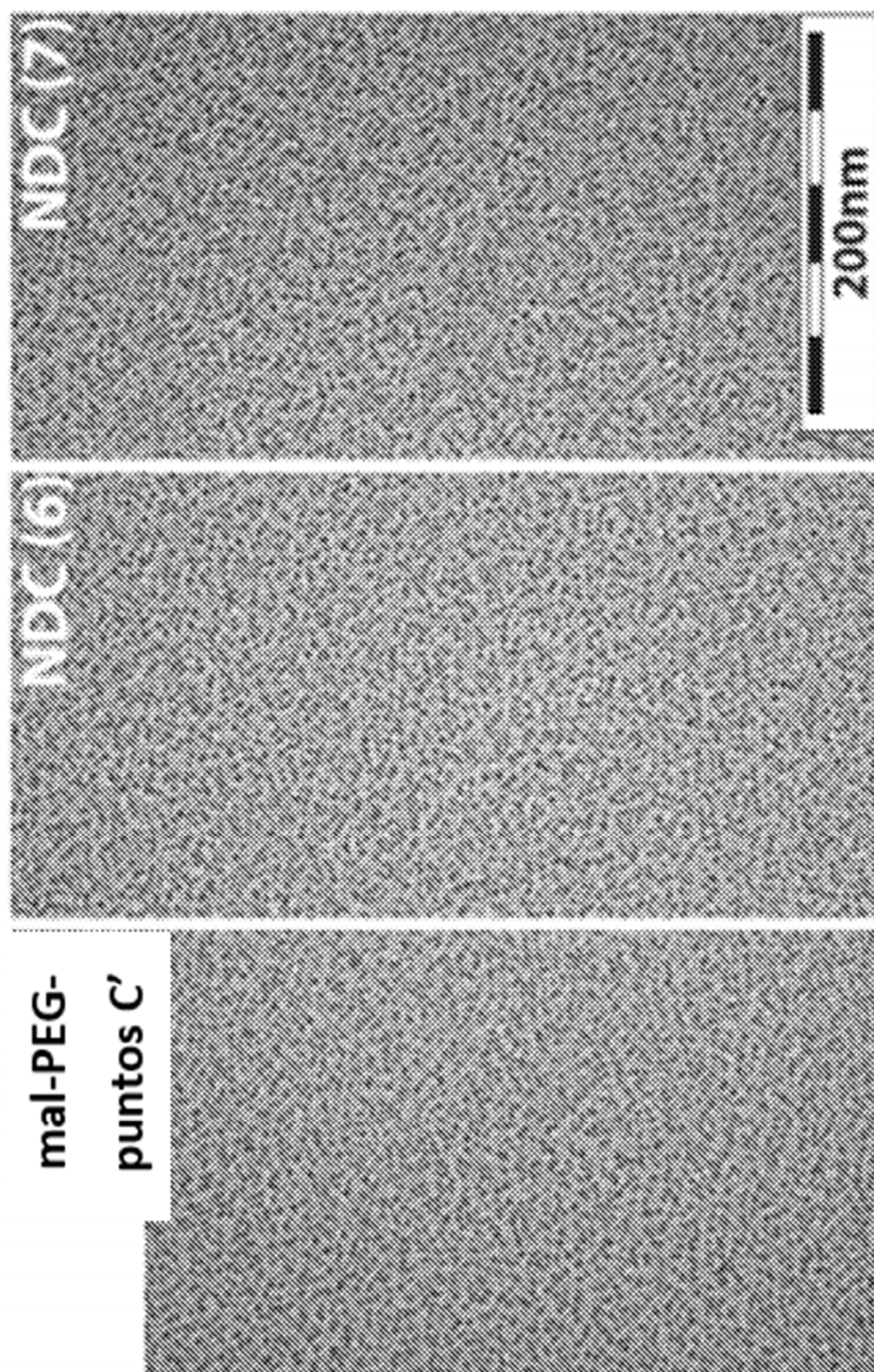




FIG. 16C

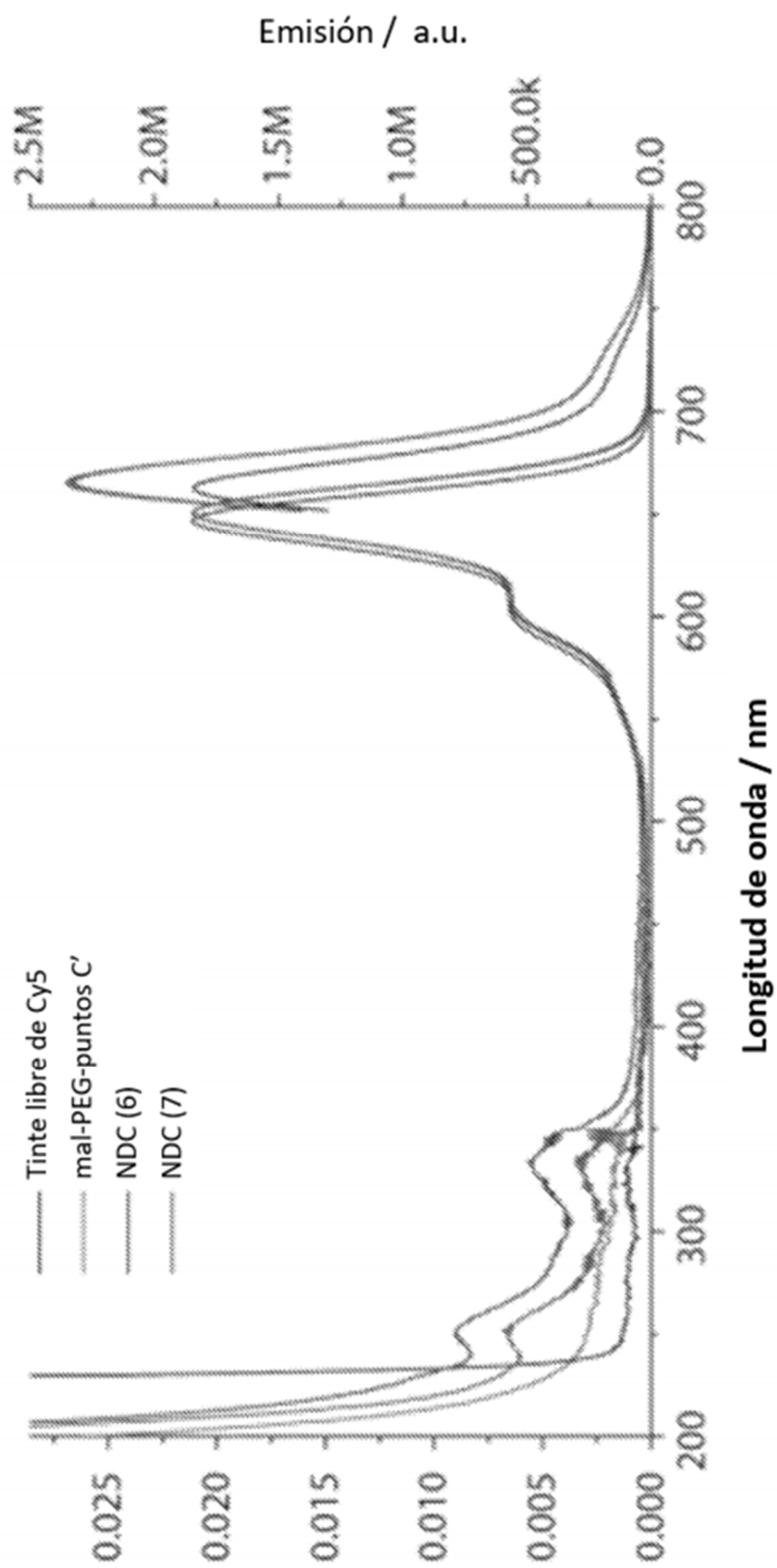


FIG. 16D

