

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 735**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61K 38/09 (2006.01)
C07D 239/24 (2006.01)
C07D 239/46 (2006.01)
C07D 239/52 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2017** **PCT/US2017/065996**
87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018** **WO18111990**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2017** **E 17880496 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** **EP 3554526**

54 Título: **Conjugados del receptor de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH-R) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

14.12.2016 US 201662434383 P
06.03.2017 US 201762467297 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2024

73 Titular/es:

PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
101 Foundry Drive, Suite 2500
West Lafayette, IN 47906, US

72 Inventor/es:

LOW, PHILIP STEWART y
ROY, JYOTI

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 983 735 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 del receptor de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH-R) y usos de los mismos

Campo técnico

5 Las presentes enseñanzas se refieren en general a conjugados y métodos para obtener imágenes de un microambiente tumoral en un paciente y a conjugados para su uso en métodos para tratar el cáncer que expresa LHRH-R en un paciente. Las presentes enseñanzas se refieren en general a un método para preparar conjugados que comprenden un antagonista de LHRH-R.

Antecedentes

10 Los fármacos terapéuticos contra el cáncer convencionales carecen de la capacidad de diferenciar entre células cancerosas y células sanas, lo que produce efectos adversos de leves a graves, tales como náuseas, pérdida de cabello, mielosupresión y cardiotoxicidad. Una estrategia para superar estos efectos secundarios implica atacar directamente a los cánceres a través de receptores o proteínas que están sobreexpresados en los cánceres pero que
15 tienen una expresión restringida en las células sanas. Esto permite la administración de fármacos citotóxicos específicamente a las células cancerosas sin afectar a las células sanas.

Asimismo, las técnicas de formación de imágenes radiactivas han ganado popularidad para identificar, estadificar y controlar de la progresión de la enfermedad. Las moléculas objetivo, incluidas moléculas pequeña, péptidos y anticuerpos se han marcado radiactivamente para desarrollar agentes de formación de imágenes para diversos
20 receptores o proteínas sobreexpresados en los cánceres. La cirugía guiada por fluorescencia es una forma eficaz de mejorar el resultado quirúrgico y la supervivencia del paciente. Actualmente, existen múltiples conjugados de colorantes NIR dirigidos a varios receptores, tales como folato, PSMA, CAIX, CCK2R y NK1R, etc. A pesar de la disponibilidad de estos conjugados de colorantes NIR dirigidos, no se pueden obtener imágenes de muchos cánceres debido a la presencia o al número muy bajo de estos receptores o a la ausencia total. Por lo tanto, existe la necesidad de conjugados de colorantes más específicos.

El receptor de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Receptor, LHRH-R), que también se conoce como receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, ha sido aceptado como
30 diana para administrar específicamente cargas útiles, tales como fármacos citotóxicos y agentes de imágenes, a los tumores que expresan este receptor. El LHRH-R pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y tiene el sitio de unión expuesto al espacio extracelular. El LHRH-R se expresa en la hipófisis y regula la producción y liberación de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (Luteinizing Hormone Releasing Hormone, LHRH) y la hormona estimulante del folículo (Follicle Stimulating Hormone, FSH). El LHRH-R también está presente en tejidos
35 extrahipotalámicos de ovario, endometrio, testículos y próstata. También hay informes que sugieren la expresión del receptor en los riñones.

La expresión de LHRH-R no solo se indica en los cánceres dependientes de hormonas sino también en los cánceres de próstata, mama, ovario, endometrio, riñón, páncreas, cerebro, piel dependientes de hormonas. Los receptores LHRH-R en el cáncer desempeñan un papel en el crecimiento y la proliferación de los cánceres. Actualmente, se utilizan tanto agonistas como antagonistas de LHRH-R para alterar el crecimiento tumoral. La expresión de LHRH-R en los tejidos sanos generalmente se limita a la hipófisis y los órganos reproductivos.

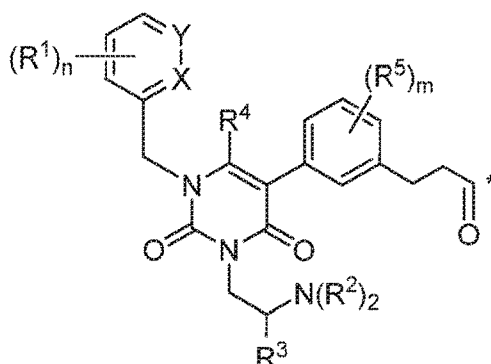
45 Actualmente, el ligando peptídico natural, LHRH o sus análogos se utilizan para apuntar al LHRH-R. Aunque se han desarrollado agentes de imágenes dirigidos a LHRH-R, dichos estudios han utilizado el péptido LHRH o su análogo o anticuerpo para desarrollar agentes de formación de imágenes dirigidos a LHRH-R. Sin embargo, estos agentes peptídicos están limitados por su propensión a una absorción inespecífica por parte del hígado y los riñones. El hígado y el riñón son órganos importantes implicados en la recuperación de los péptidos. Por esta razón, estos órganos expresan receptores eliminadores de péptidos que dan como resultado una absorción inespecífica del conjugado de fármaco citotóxico basado en péptidos y causan daño a estos órganos.

El documento US-A-2006/0247177 divulga un compuesto que comprende un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina conjugado con un resto hormonal, o un derivado del mismo, que es capaz de unirse a una proteína de unión a hormonas plasmáticas y que puede usarse para tratar trastornos dependientes de hormonas como el cáncer.

Sumario

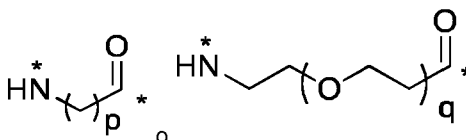
El alcance de la presente invención se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas y no se ve afectado en ningún grado por las declaraciones contenidas en este sumario.

60 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de la fórmula B-L-A, en donde B es un antagonista de la unión a LHRH-R de la fórmula



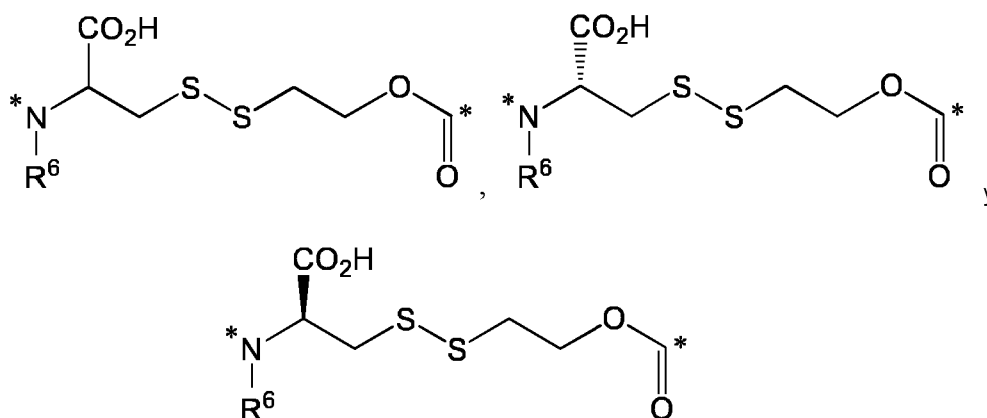
en donde cada R^1 es independientemente halógeno, alquilo C_1-C_6 o alquilo $-OC_1-C_6$; cada R^2 es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6 ; R^3 es alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{10} o alquilo C_1-C_6 -(arilo C_6-C_{10}); R^4 es alquilo C_1-C_6 ; cada R^5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo $-OC_1-C_6$, alquilo $-SC_1-C_6$ y arilo $-OC_6-C_{10}$; X e Y son cada uno independientemente N, CH o CR^1 ; siempre que cuando X es N, Y es CH o CR^1 , y cuando Y es N, X es CH o CR^1 ; m es un número entero de 0 a 4; n es un número entero de 0 a 3; y * representa un enlace covalente con L; L es un enlazador seleccionado entre el grupo que consiste en

- (a) al menos un aminoácido, seleccionado preferentemente entre el grupo que consiste en Lys, Asn, Thr, Ser, Ile, Met, Pro, His, Gln, Arg, Gly, Asp, Glu, Ala, Val, Phe, Leu, Tyr, Cys y Trp; o
- (b) al menos dos aminoácidos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Glu y Cys; o
- (c) una porción de aminoácido de la fórmula Glu-Glu, en donde los ácidos glutámicos están unidos covalentemente entre sí a través de las cadenas laterales de ácido carboxílico; o
- (d) uno o más enlazadores espaciadores hidrófilos que comprenden una pluralidad de grupos funcionales hidroxilo; o
- (e) una fracción de la fórmula



en donde p es un número entero de 3 a 10, q es un número entero de 3 a 100; y cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; o

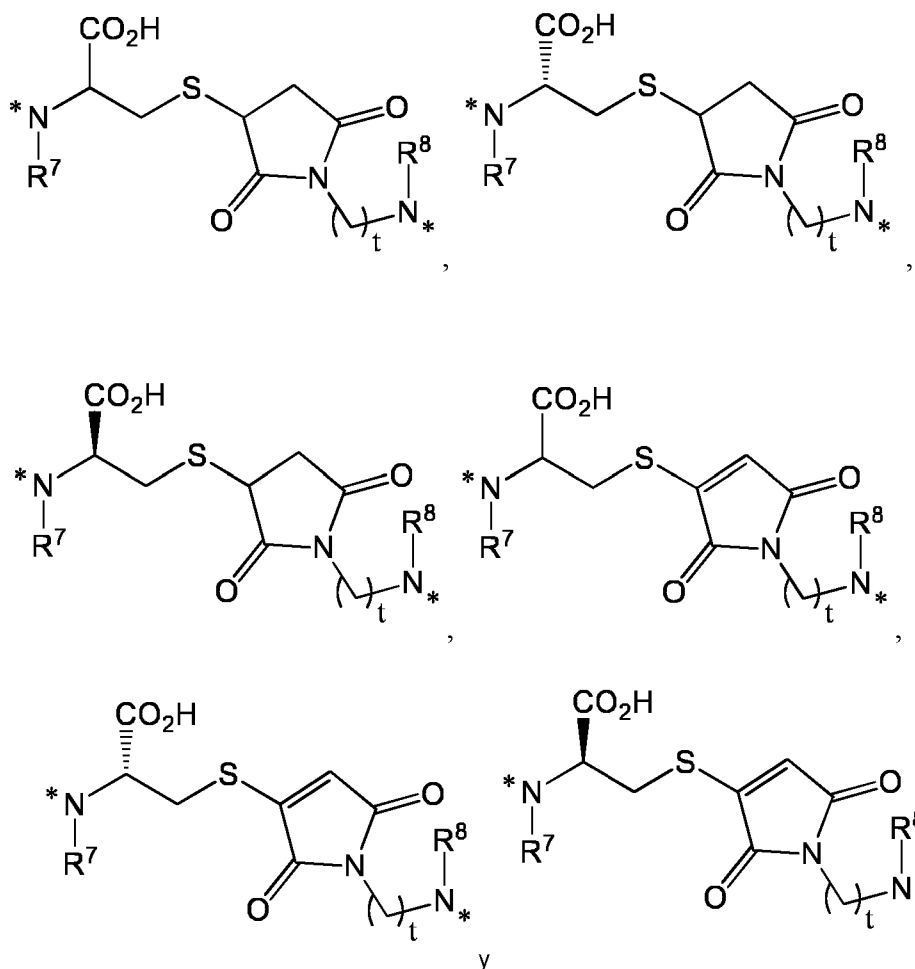
- (f) una porción seleccionada entre el grupo que consiste en



en donde R^6 es H o alquilo C_1-C_6 ; y

cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; o

- (g) en donde el enlazador comprende una porción seleccionada entre el grupo que consiste en



5

en donde

10 cada uno de R⁷ y R⁸ es independientemente H o alquilo C₁-C₆;

t es un número entero de 1 a 8; y

15 cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; y

(h) combinaciones de los mismos; y A es un fármaco terapéuticamente eficaz contra las células cancerosas

y/o fibroblastos asociados al cáncer (Cancer-Associated Fibroblast, CAF) o un agente de formación de imágenes; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado como se describe en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado como se describe en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para tratar el cáncer que expresa LHRH-R en un sujeto.

30

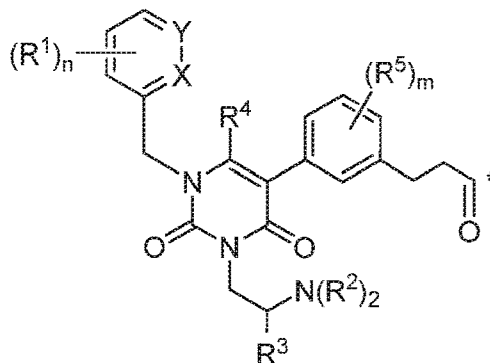
En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para obtener imágenes de una población de células *in vitro*, que comprende a. poner en contacto las células con un conjugado como se describe en el presente documento, proporcionar células marcadas y b. visualizar las celdas marcadas.

35

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para obtener imágenes de una población de células *in vivo*, que comprende a. administrar a un paciente una cantidad eficaz de un conjugado como se describe en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para proporcionar células marcadas; y b. visualizar las células marcadas mediante imágenes.

Varias realizaciones de la invención se describen en las siguientes cláusulas enumeradas:

1. Un conjugado de la fórmula B-L-A, en donde B es un antagonista de la unión a LHRH-R de la fórmula



en donde

cada R¹ es independientemente halógeno, alquilo C₁-C₆ o alquilo -OC₁-C₆,

cada R² es independientemente H, alquilo C₁-C₆ o cicloalquilo C₃-C₆,

R³ es alquilo C₁-C₆, C₃-C₆, cicloalquilo, arilo C₆-C₁₀ o alquilo C₁-C₆-(arilo C₆-C₁₀);

R⁴ es alquilo C₁-C₆;

cada R⁵ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, alquilo C₁-C₆, alquilo -OC₁-C₆, alquilo -SC₁-C₆ y arilo -OC₆-C₁₀;

X e Y son cada uno independientemente N, CH o CR¹; siempre que cuando X es N, Y es CH o CR¹, y cuando Y es N, X es CH o CR¹;

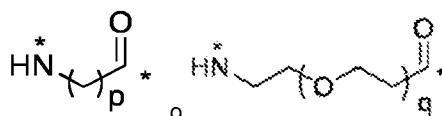
m es un número entero de 0 a 4;

n es un número entero de 0 a 3; y

* representa un enlace covalente con L;

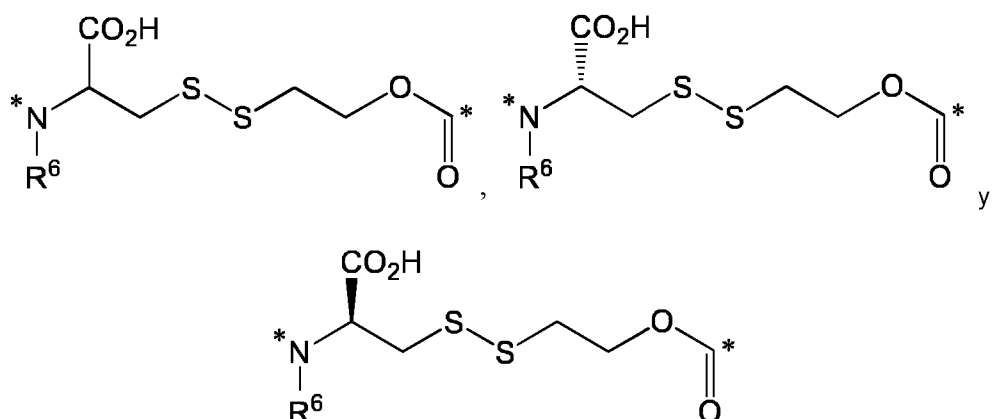
L es un enlazador seleccionado entre el grupo que consiste en

- (a) al menos un aminoácido, seleccionado preferentemente entre el grupo que consiste en Lys, Asn, Thr, Ser, Ile, Met, Pro, His, Gln, Arg, Gly, Asp, Glu, Ala, Val, Phe, Leu, Tyr, Cys y Trp; o
- (b) al menos dos aminoácidos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Glu y Cys; o
- (c) una porción de aminoácido de la fórmula Glu-Glu, en donde los ácidos glutámicos están unidos covalentemente entre sí a través de las cadenas laterales de ácido carboxílico; o
- (d) uno o más enlazadores espaciadores hidrófilos que comprenden una pluralidad de grupos funcionales hidroxilo; o
- (e) una fracción de la fórmula



en donde p es un número entero de 3 a 10, q es un número entero de 3 a 100; y cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; o

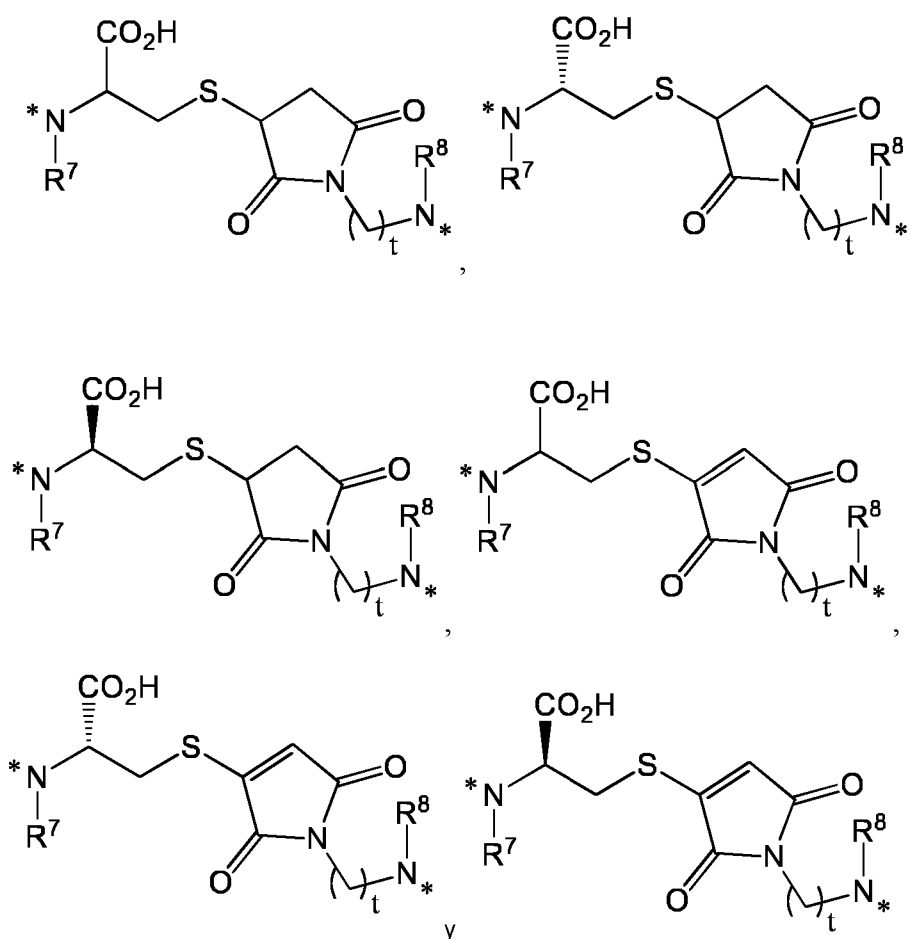
- (f) una porción seleccionada entre el grupo que consiste en



5 en donde R^6 es H o alquilo C_1 - C_6 ; y

cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; o

10 (g) en donde el enlazador comprende una porción seleccionada entre el grupo que consiste en



15

en donde

cada uno de R^7 y R^8 es independientemente H o alquilo C_1 - C_6 ;

20

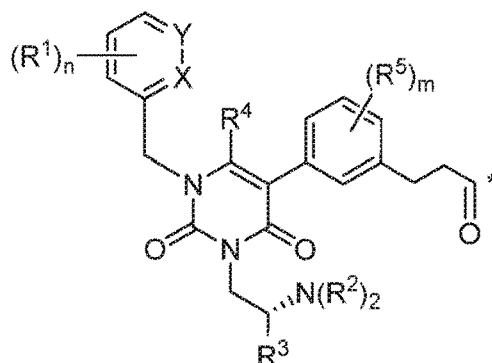
t es un número entero de 1 a 8; y

cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; y

- (h) combinaciones de los mismos; y A es un fármaco terapéuticamente eficaz contra células cancerosas y/o fibroblastos asociados al cáncer (CAF) o un agente de formación de imágenes; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5

2. El conjugado de la cláusula 1 de la fórmula



10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

3. El conjugado de la cláusula 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde n es 2.

4. El conjugado de la cláusula 1, 2 o 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde m es 0.

15

5. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R¹, si está presente, es F.

20

6. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R¹, si está presente, es F en las posiciones 2 y 6 del anillo al que cada R¹ está unido.

7. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R² es H.

25

8. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R³ es alquilo C₁-C₆-(arilo C₆-C₁₀).

9. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R³ -CH₂-C₆H₅.

30

10. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R⁴ es metilo.

35

11. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R⁵, cuando está presente, es F, Cl, -CH₃, -OCH₃, -OC₆H₅ o -SC₆H₅.

12. El conjugado de la cláusula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde X es N e Y es CH.

40

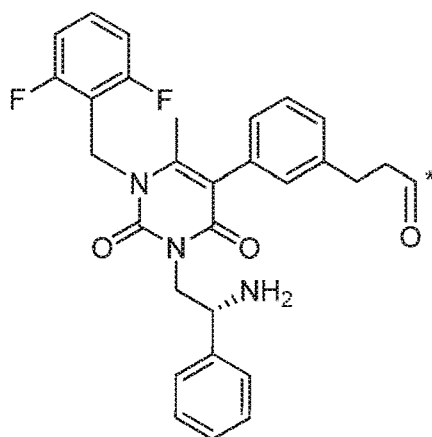
13. El conjugado de la cláusula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde Y es N y X es CH.

14. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas 1 a 11, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde X es CR¹ e Y es CH o CR¹.

45

15. El conjugado de la cláusula 14, en donde X es -CF e Y es CH.

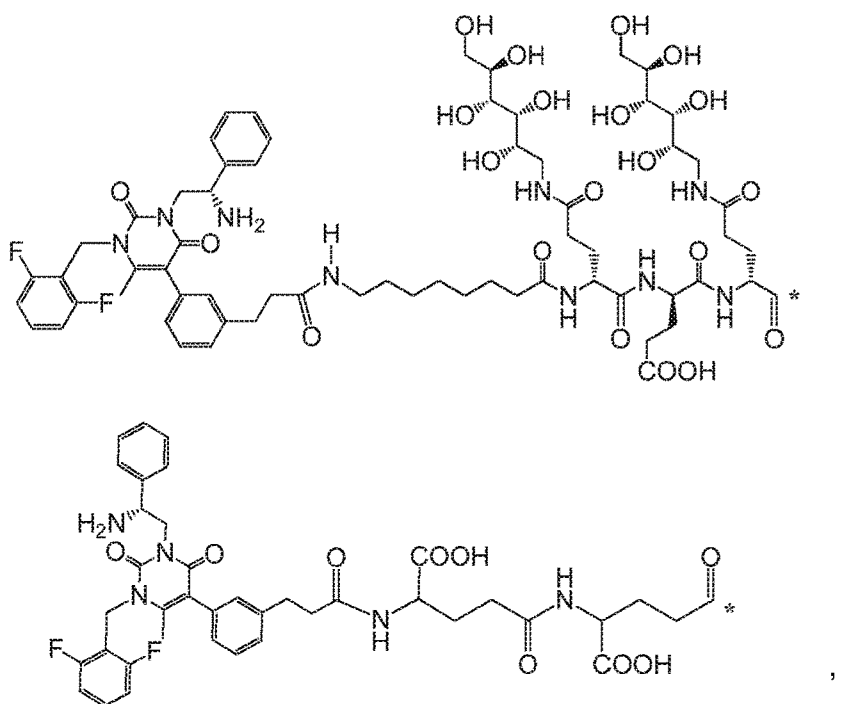
16. El conjugado de la cláusula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde B es de la fórmula

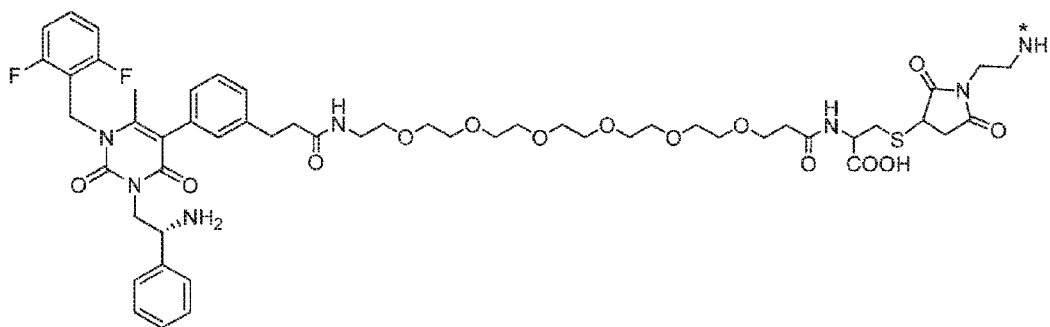
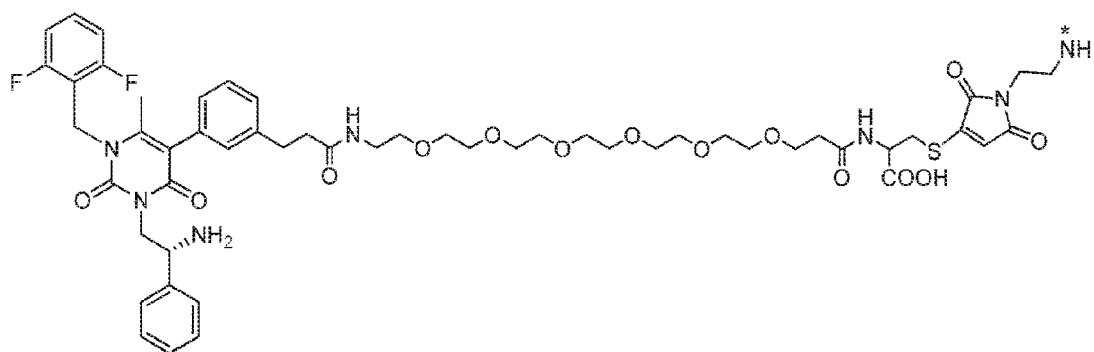
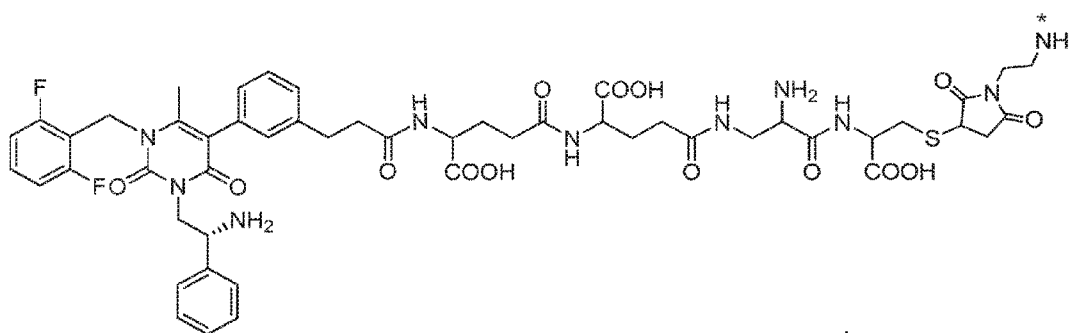
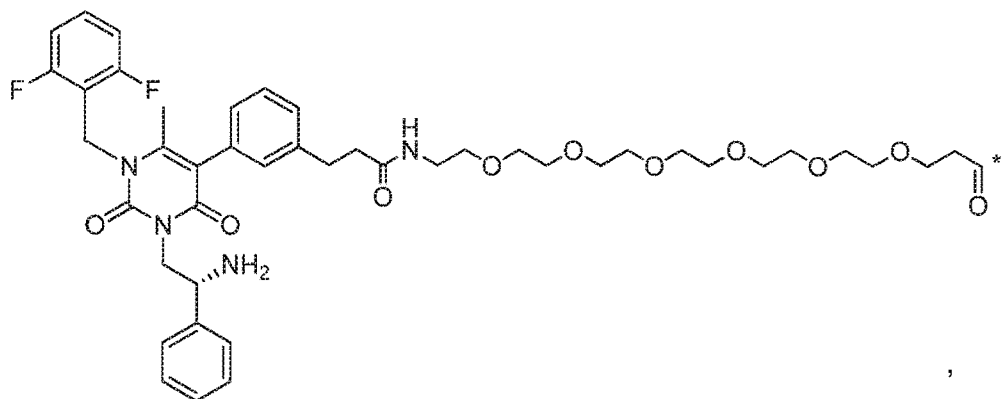


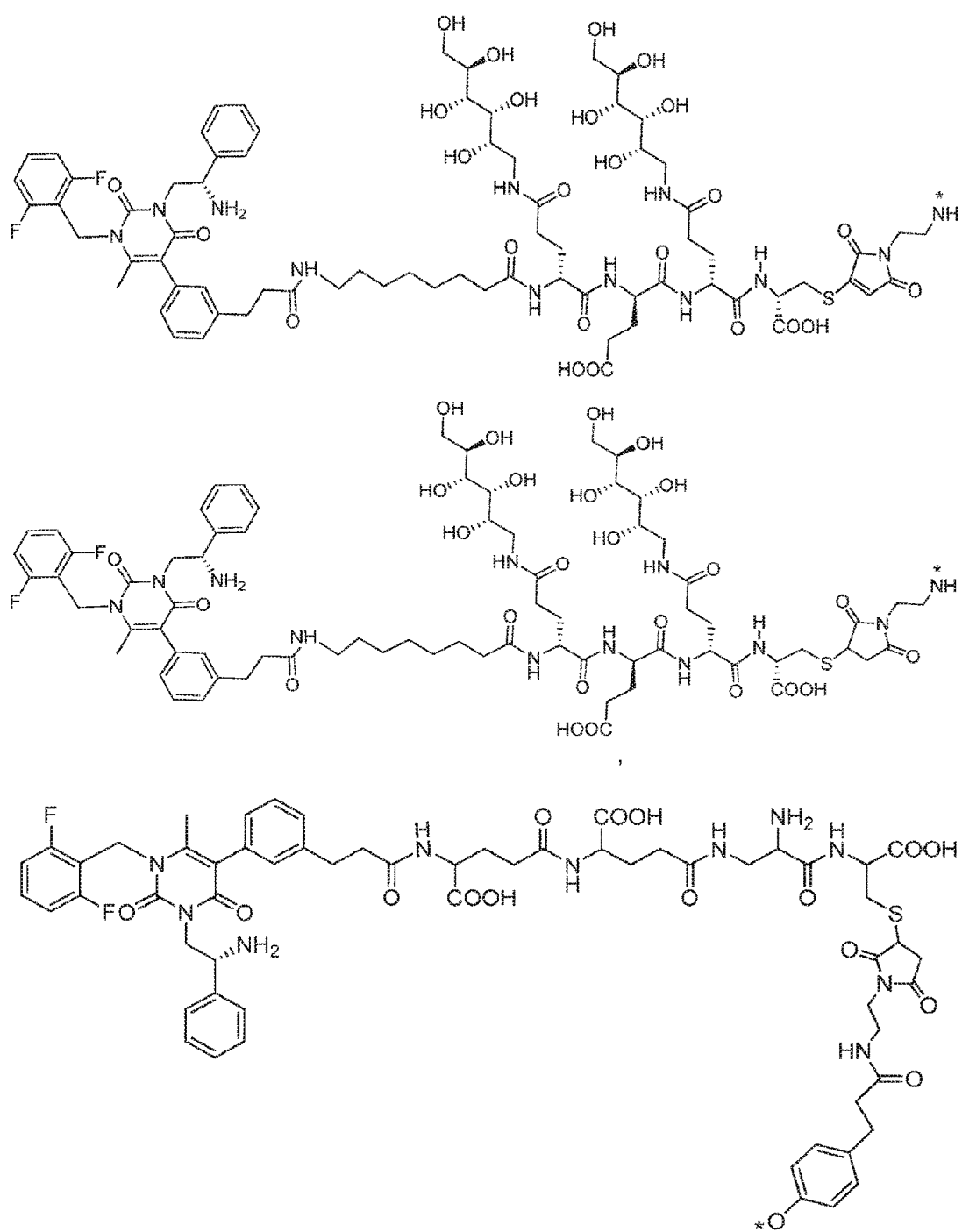
en donde * representa un enlace covalente con L.

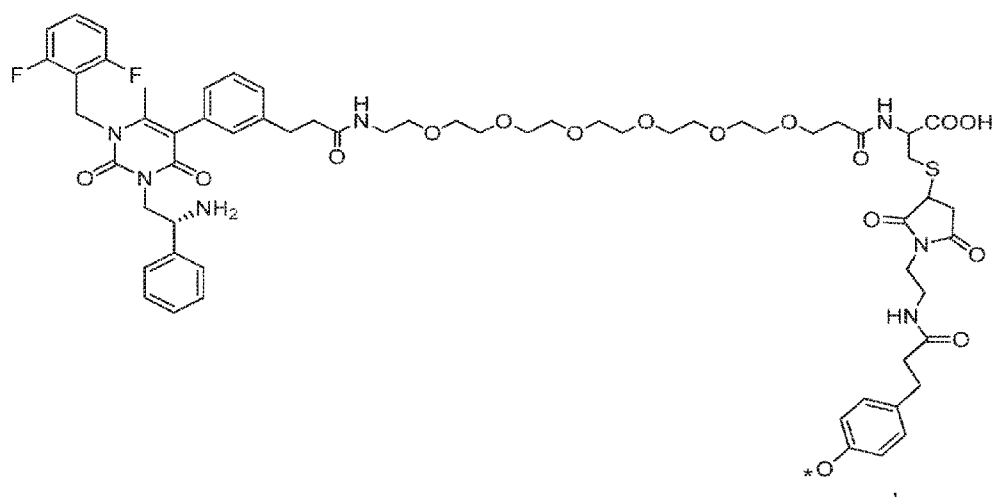
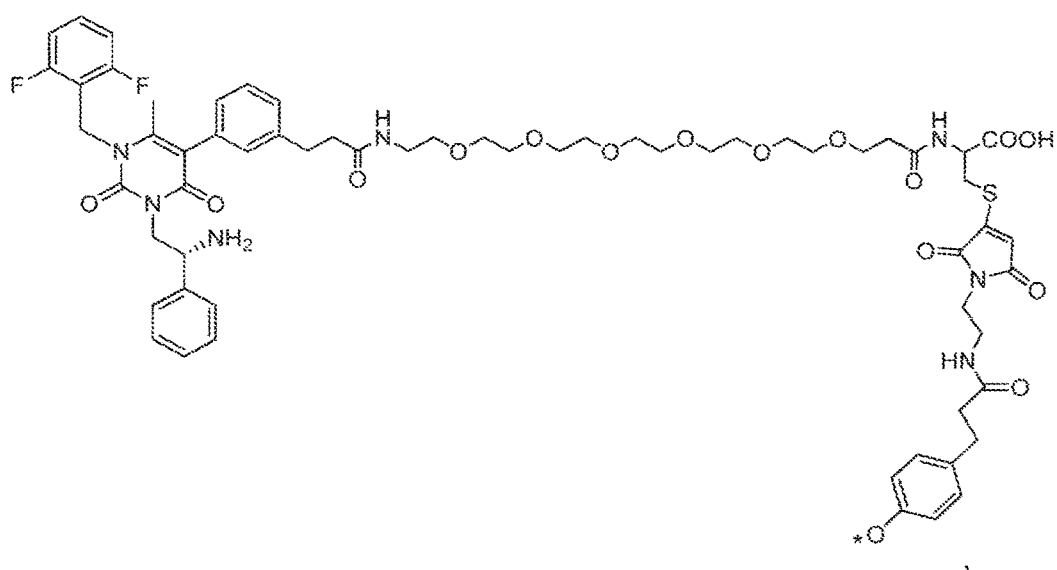
5 17. El conjugado de la cláusula 1(c), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde R^7 y R^8 son H; y
t es 2.

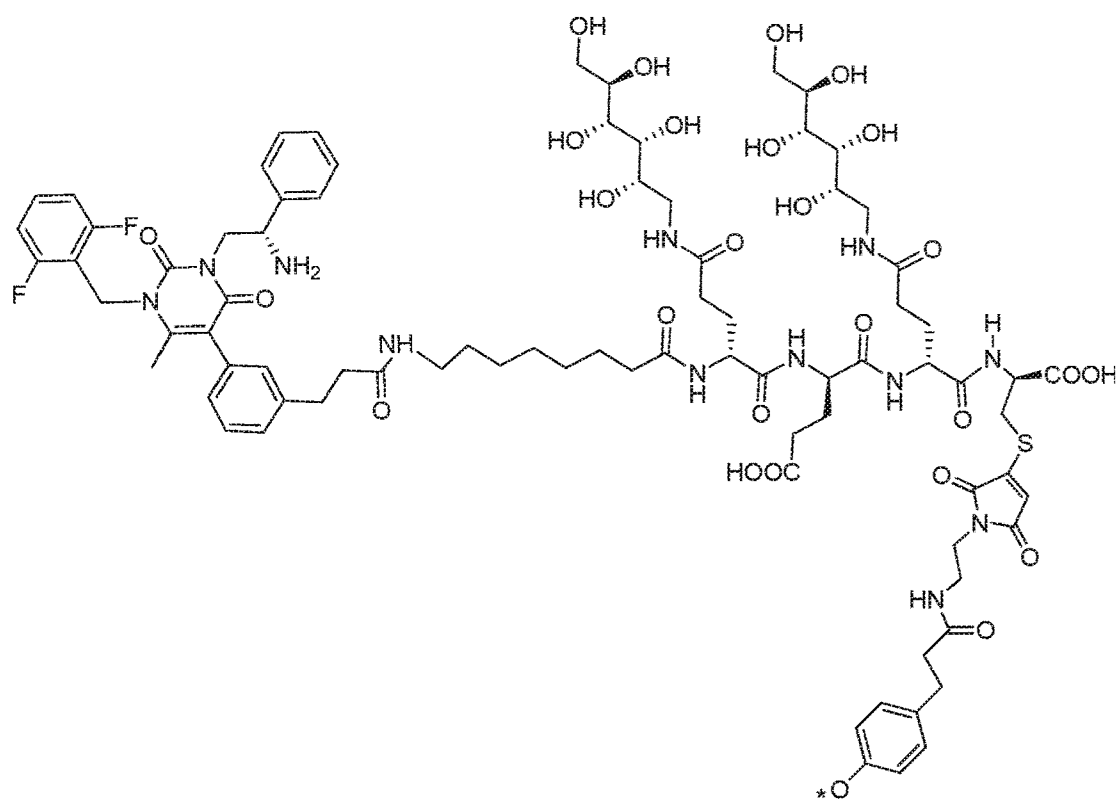
10 18. El conjugado de la cláusula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la fórmula



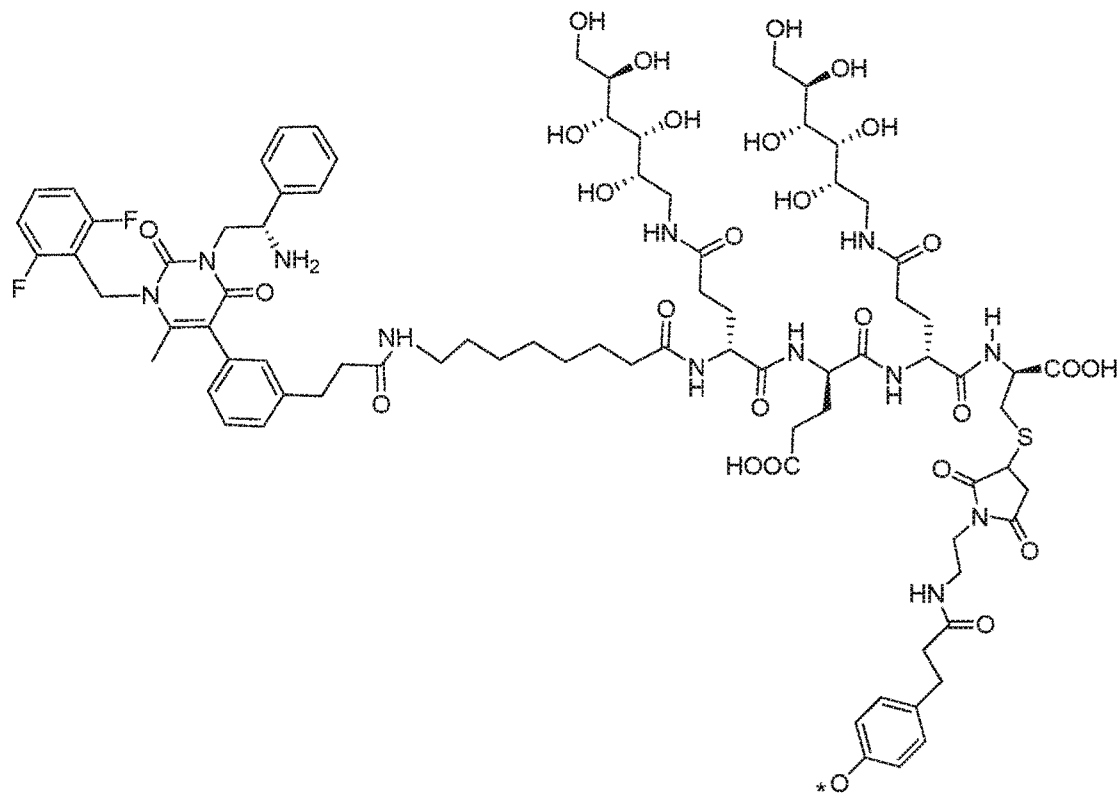








o



5 en donde * representa un enlace covalente con el resto del conjugado.

19. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde A es un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en un alcaloide de vinca, una criptoficina, bortezomib, tiobortezomib, una tubulisina, aminopterina,

rapamicina, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, everolimus, α -amanatina, verucarina, didemnina B, geldanomicina, purvalanol A, ispinesib, budesonida, dasatinib, una epotilona, una maitansina y un inhibidor de tirosina quinasa.

5 20. El conjugado de la cláusula 19 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el fármaco es una tubulicina.

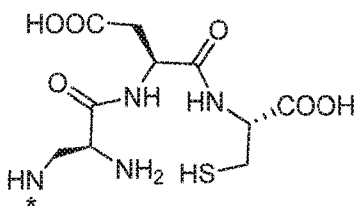
21. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas 1 a 18, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde A es un agente de formación de imágenes.

10 22. El conjugado de la cláusula 21 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde A es un agente de formación de imágenes seleccionado entre el grupo que consiste en un colorante de rodamina, un colorante de fluoresceína, un agente de formación de imágenes PET o un agente radiomarcado.

15 23. El conjugado de la cláusula 22 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde: A se selecciona entre el grupo que consiste en S0456, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), rodamina B, rodamina 6G, TRITC, Rojo Texas, rodamina 123, suiforodamina 101, fluoresceína, 5-amino-fluoresceína, 6-amino-fluoresceína, isocianato de fluoresceína (FITC), NHS-fluoresceína, Verde Oregón, Verde Tokio, Verde Singapur y Verde Filadelfia.

20 24. El conjugado de una cualquiera de las cláusulas 1 a 18, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde A es un isótopo radiactivo, tal como un isótopo radiactivo de un metal, coordinado a un grupo quelante.

25 25. El conjugado de la cláusula 24, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el grupo quelante de la fórmula

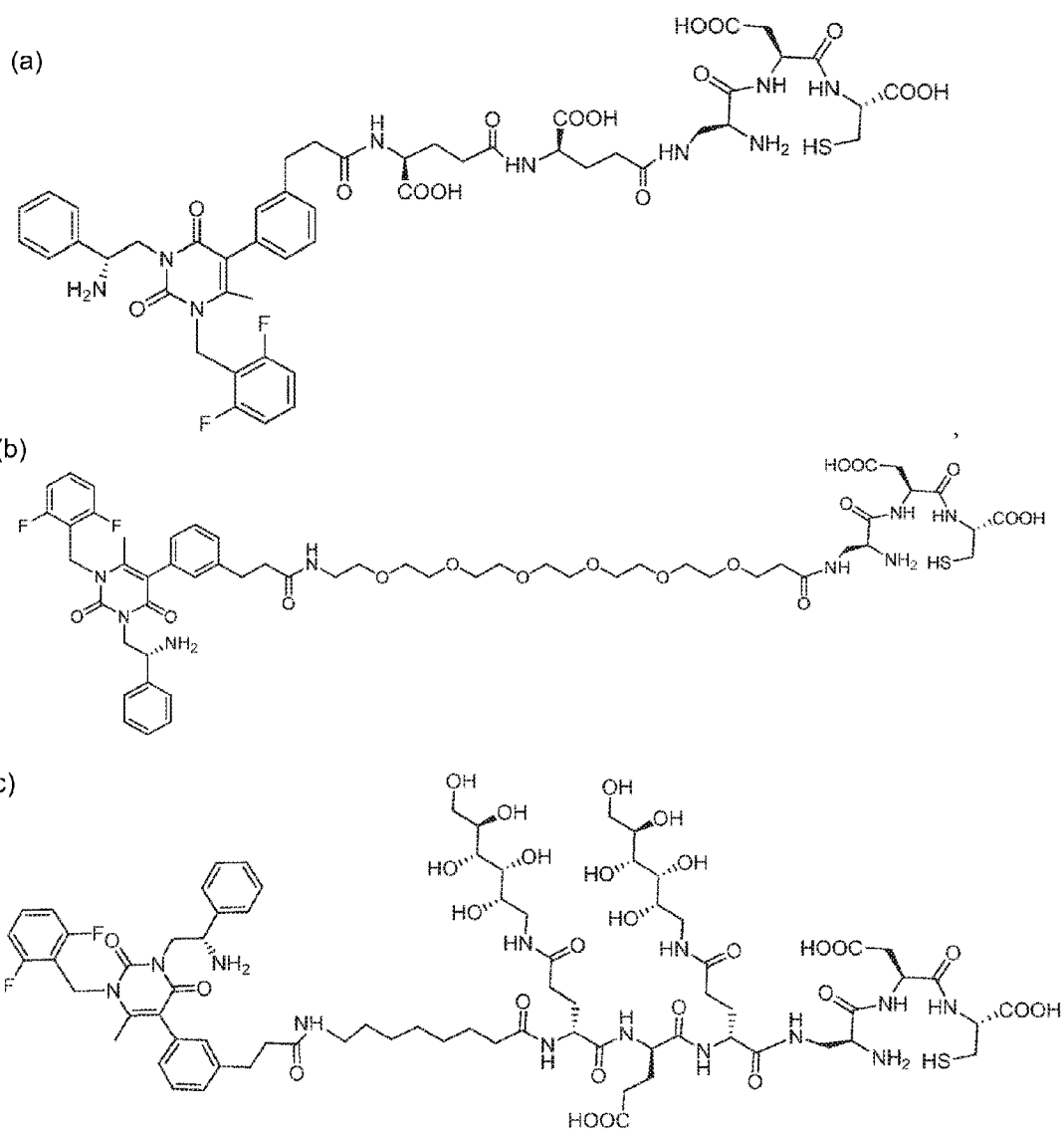


en donde * representa un enlace covalente con el resto del conjugado.

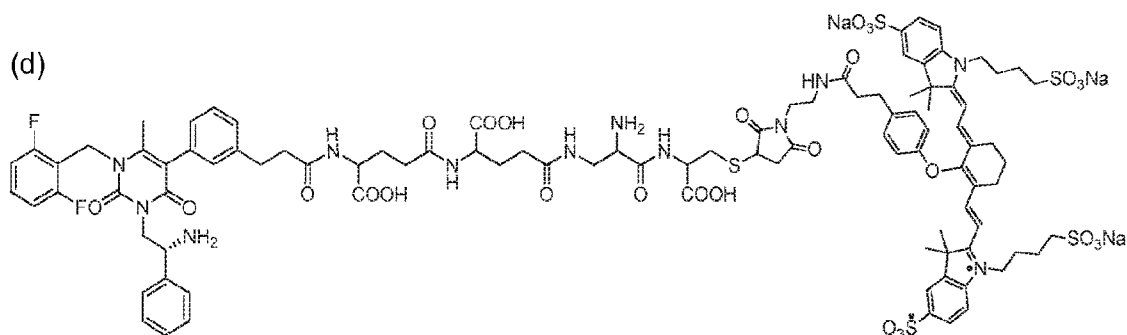
30 26. El conjugado de la cláusula 24 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el grupo quelante comprende un isótopo metálico radiactivo seleccionado entre el grupo que consiste en un isótopo de tecnecio, renio, galio, gadolinio, indio y cobre coordinados con el mismo.

35 27. El conjugado de la cláusula 24 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el grupo quelante comprende un isótopo metálico radiactivo seleccionado entre el grupo que consiste en ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga coordinados con el mismo.

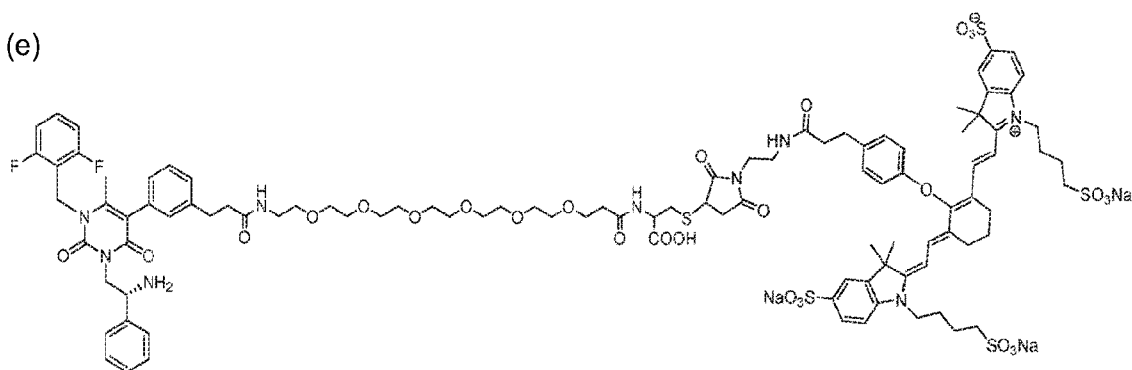
28. El conjugado de la cláusula 1, seleccionado del grupo que consiste en



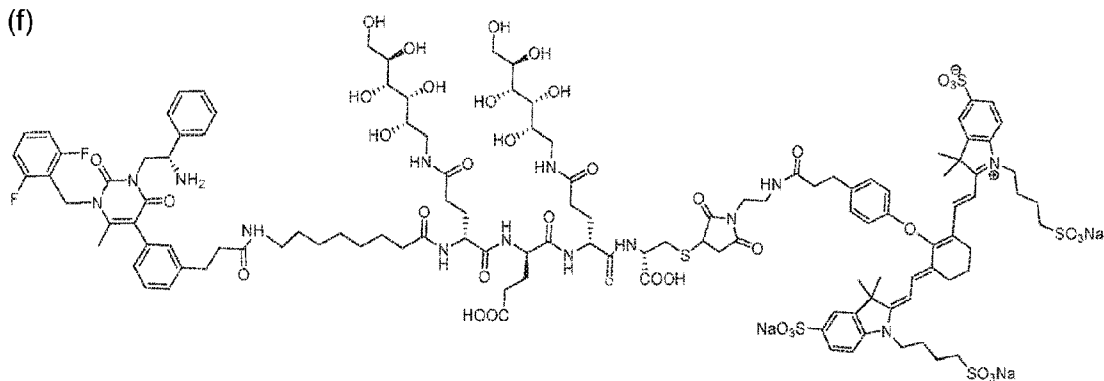
- 5 en donde en (a), (b) o (c) el conjugado comprende un isótopo metálico radiactivo seleccionado entre el grupo que consiste en ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga coordinado con el mismo, preferentemente $^{99\text{m}}\text{Tc}$,



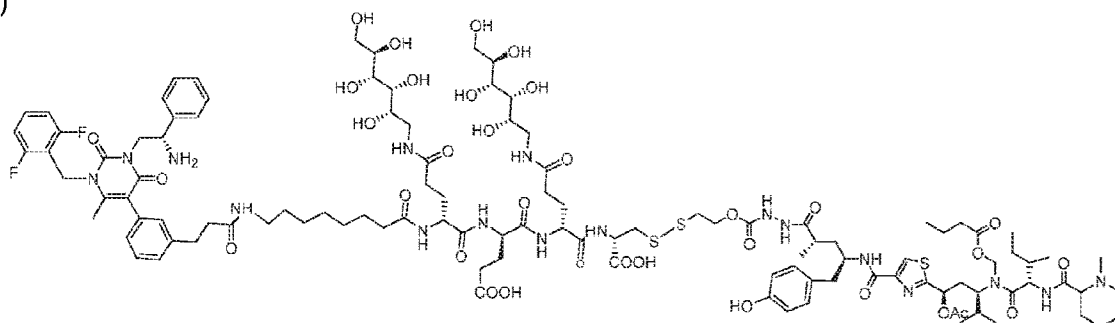
(e)



(f)



(g)



5

y una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a)-(g).

29. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de cualquiera de las cláusulas anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

30. Un conjugado según una cualquiera de las cláusulas 1 a 20 o 28(g), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para tratar el cáncer que expresa LHRH-R en un sujeto.

15

31. El conjugado de la cláusula 30, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad del conjugado eficaz para tratar el cáncer que expresa LHRH.

32. El conjugado de la cláusula 30 o 31, en donde el cáncer que expresa LHRH-R se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de próstata, endometrio, piel, pancreático, mama, riñón, ovario y cerebro.

20

33. Un método para la formación de imágenes de una población de células *in vitro*, que comprende

a. poner en contacto las células con un conjugado según una cualquiera de las cláusulas 1 a 18 o 21 a 27 para proporcionar células marcadas, y b. visualizando las celdas marcadas.

25

34. Un método para la formación de imágenes de una población de células *in vivo*, que comprende

a. administrar a un paciente una cantidad eficaz de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 18 o 21 o 27 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para proporcionar células marcadas; y b. visualizar las células marcadas mediante formación de imágenes.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura química y un trazo de CL/EM para JR-L1-S0456.

La figura 2 muestra la estructura química y un trazo de CL/EM para JR-L2-S0456.

10

La figura 3 muestra la estructura química y un trazo de CL/EM para JR-L2-S0456.

La figura 4 muestra la estructura química y un perfil de HPLC radiactivo para JR-L3-A.

15

La figura 5 muestra la estructura química y un trazo de CL/EM para JR-L2 rodamina.

La figura 6 muestra la estructura química y un trazo de CL/EM para JR-L3.

20

La figura 7 muestra la estructura química y un trazo de CL/EM para JR-L3-TubBH.

La figura 8 muestra la estructura química y un trazo de CL/EM para S0456 maleimida.

La figura 9 muestra la unión *in vitro* de JL-L3-S0456 para células de cáncer de mama MDA-MB231 que expresan LHRH-R según lo determinado por fluorescencia frente a la concentración.

25

La figura 10A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L1-S0456 en xenoinjertos de tumores MCF-7.

30

La figura 10B muestra la absorción de JL-L1-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 10A.

La figura 11A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L2-S0456 en xenoinjertos de tumores MDA-MB231.

35

La figura 11B muestra la absorción de JL-L2-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 11A.

La figura 12A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores MDA-MB231.

40

La figura 12B muestra la absorción de JL-L3-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 12A.

La figura 13A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores HEC-1B.

45

La figura 13B muestra la absorción de JL-L3-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 13A.

La figura 14A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores OVCAR3.

50

La figura 14B muestra la absorción de JL-L3-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 14A.

La figura 15A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 2 horas después de la inyección.

55

La figura 15B muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 8 horas después de la inyección.

La figura 15C muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 12 horas después de la inyección.

60

La figura 15D muestra la absorción de JL-L3-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 15A.

La figura 15E muestra la absorción de JL-L3-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 15B.

La figura 15F muestra la absorción de JL-L3-S0456 por diversos órganos en los ratones de la figura 15C.

65

La figura 16 muestra la unión *in vitro* de JL-L3A a células de cáncer de mama MDA-MB231 que expresan LHRH-R

según lo determinado por radiactividad frente a la concentración.

La figura 17A muestra la absorción *in vivo* de JL-L1A en ratones tratados y de competición.

5 La figura 17B muestra la absorción *in vivo* de JL-L2A en ratones tratados y de competición.

La figura 17C muestra la absorción *in vivo* de JL-L3A en ratones tratados y de competición.

10 La figura 18A muestra la biodistribución *in vivo* de JL-L1A en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 2 horas y 4 horas después de la inyección.

La figura 18B muestra la biodistribución *in vivo* de JL-L2A en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 2 horas y 4 horas después de la inyección.

15 La figura 18C muestra la biodistribución *in vivo* de JL-L3A en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 2 horas y 4 horas después de la inyección.

20 La figura 19A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de JL-L1A en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 2 horas después de la inyección.

La figura 19B muestra la absorción *in vivo* del conjugado de JL-L2A en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 4 horas después de la inyección.

25 La figura 19C muestra la absorción *in vivo* del conjugado JL-L3A en xenoinjertos de tumores MDA-MB231 8 horas después de la inyección.

La figura 19D muestra el porcentaje de dosis inyectada/g de tejido para los órganos respectivos a las 2 horas, 4 horas y 8 horas.

30 La figura 20 muestra imágenes confocales que muestran la unión *in vitro* del conjugado JL-L3-Rodamina a células MDA-MB-231 (positivas para el receptor) y SKVO3 (negativas para el receptor).

35 La figura 21A muestra la unión *in vitro* de TubBH y JL-L3-TubBH a células positivas para LHRH-R (MDA-MB-231) JL-L3-S0456 según lo determinado por incorporación de timidina ³H frente a la concentración.

La figura 21b muestra la unión *in vitro* de TubBH y JL-L3-TubBH a células negativas para LHRH-R (SKOV3) JL-L3-S0456 según lo determinado por incorporación de timidina ³H frente a la concentración.

40 La figura 22 A muestra la eficacia terapéutica de JL-L3-TubBH contra células positivas para LHRH-R determinada por el volumen del tumor a lo largo del tiempo.

La figura 22B muestra la eficacia terapéutica de JL-L3-TubBH contra células negativas para LHRH-R determinada por el volumen del tumor a lo largo del tiempo.

45 La figura 22C muestra la toxicidad de JL-L3-TubBH contra células positivas para LHRH-R determinado por el cambio de peso a lo largo del tiempo.

50 La figura 22D muestra la toxicidad de JL-L3-TubBH contra células positivas para LHRH-R determinada por el volumen del tumor a lo largo del tiempo.

La figura 23A muestra la eficacia terapéutica de JL-L3-TubBH contra el crecimiento tumoral subcutáneo MDA-MB231 positivo para LHRH-R determinado por el volumen del tumor a lo largo del tiempo.

55 La figura 23B muestra la toxicidad de JL-L3-TubBH contra el crecimiento tumoral subcutáneo MDA-MB231 positivo para LHRH-R determinado por el cambio de peso a lo largo del tiempo.

Definiciones

60 Como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" incluye una cadena de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada y contiene de 1 a 20 átomos de carbono. Debe entenderse que en determinadas realizaciones, el alquilo puede tener ventajosamente una longitud limitada, incluyendo C₁-C₁₂, C₁-C₁₀, C₁-C₉, C₁-C₈, C₁-C₇, C₁-C₆ y C₁-C₄. De manera ilustrativa, tales grupos alquilo de longitud particularmente limitada, incluyendo C₁-C₈, C₁-C₇, C₁-C₆, y C₁-C₄, y similares pueden denominarse "alquilo inferior". Los grupos alquilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo y similares. El alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Los grupos sustituyentes típicos incluyen cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcoxi, arilo, mercapto, alquiltio,

- arilitio, ciano, halo, carbonilo, oxo, (=O), tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, nitro y amino, o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento. Se entenderá que "alquilo" puede combinarse con otros grupos, tales como los proporcionados anteriormente, para formar un alquilo funcionalizado. A modo de ejemplo, la combinación de un grupo
- 5 "alquilo", tal como se describe en el presente documento, con un grupo "carboxi" puede denominarse grupo "carboxialquilo". Otros ejemplos no limitantes incluyen hidroxialquilo, aminoalquilo y similares. En otras realizaciones, un grupo "alquilo" se puede combinar con otro grupo, tal como un grupo asilo, por ejemplo C₆-C₁₀, aril-(alquilo C₁-C₆), que proporciona un grupo tal como bencilo (es decir, C₆H₅-CH₂-).
- 10 Como se utiliza en el presente documento, el término "alquenilo" incluye una cadena de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificado y contiene de 2 a 20 átomos de carbono y también incluye al menos un doble enlace carbono-carbono (es decir, C=C). Se entenderá que en determinadas realizaciones, el alquenilo puede tener ventajosamente una longitud limitada, incluyendo C₂-C₁₂, C₂-C₉, C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆ y C₂-C₄. De manera ilustrativa, tales grupos alquenilo de longitud particularmente limitada, incluyendo C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆ y C₂-C₄ puede denominarse
- 15 alquenilo inferior. El alquenilo puede estar no sustituido o sustituido como se describe para alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento. Los grupos alquenilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-, 2- o 3-butenilo y similares.
- 20 Como se utiliza en el presente documento, el término "alquinilo" incluye una cadena de átomos de carbono, que está opcionalmente ramificada y contiene de 2 a 20 átomos de carbono, y también incluye al menos un triple enlace carbono-carbono (es decir, C≡C). Se entenderá que en determinadas realizaciones cada uno de los alquinilo puede tener ventajosamente una longitud limitada, incluyendo C₂-C₁₂, C₂-C₉, C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆ y C₂-C₄. De manera ilustrativa, tales grupos alquinilo de longitud particularmente limitada, incluyendo C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆ y C₂-C₄ puede denominarse
- 25 alquinilo inferior. El alquenilo puede estar no sustituido o sustituido como se describe para alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento. Los grupos alquenilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-, 2- o 3-butinilo y similares.
- 30 Como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un grupo monocíclico o policíclico de anillo condensado totalmente carbonado de 6 a 12 átomos de carbono que tiene un sistema de electrones pi completamente conjugado. Se entenderá que en determinadas realizaciones, arilo puede ser ventajosamente de tamaño limitado tal como arilo C₆-C₁₀. Los grupos arilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftalenilo y antracenilo. El grupo arilo puede estar no sustituido o sustituido como se describe para alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.
- 35 Como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un anillo monocíclico totalmente carbonado de 3 a 15 miembros, un anillo bicíclico condensado de 5 miembros/6 miembros o de 6 miembros/6 miembros todo carbonado o un anillo condensado multicíclico (un sistema de anillos "condensado" significa que cada anillo en el sistema comparte un par adyacente de átomos de carbono con el otro anillo en el sistema) grupo donde uno o más de los anillos pueden contener uno o más dobles enlaces pero el cicloalquilo no contiene un sistema de
- 40 electrones pi completamente conjugado. Se entenderá que en determinadas realizaciones, el cicloalquilo puede ser ventajosamente de tamaño limitado, tal como C₃-C₁₃, C₃-C₆, C₃-C₆ y C₄-C₆. El cicloalquilo puede estar no sustituido o sustituido como se describe para alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento. Los grupos cicloalquilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, adamantilo, norbornilo,
- 45 norbornenilo, 9H-fluoren-9-ilo y similares.
- 50 Como se utiliza en el presente documento, el término "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo anular monocíclico o condensado que tiene en el(los) anillo(s) de 3 a 12 átomos en el anillo, en donde al menos un átomo del anillo es un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre, siendo el resto de átomos en el anillo átomos de carbono. El heterocicloalquilo puede contener opcionalmente 1, 2, 3 o 4 heteroátomos. El heterocicloalquilo también puede tener uno o más dobles enlaces, incluyendo dobles enlaces con nitrógeno (por ejemplo, C=N o N=N), pero no contiene un sistema de electrones pi completamente conjugado. Se entenderá que en determinadas realizaciones, heterocicloalquilo puede ser ventajosamente de tamaño limitado ta, como heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros y similares. El heterocicloalquilo puede estar no sustituido o sustituido como se describe para alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento. Los grupos heterocicloalquilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, oxiranilo, tianarilo, azetidino, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, raorfolinilo, 1,4-ditianilo, piperazinilo, oxepanilo, 3,4-dihidro-2H-piranilo, 5,6-dihidro-2H-piranilo, 2H-piranilo, 1,2,3,4-tetrahidropiridinilo y similares.
- 55 60 Como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o condensado de 5 a 12 átomos de anillo que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos de anillo seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre, siendo los átomos del anillo restantes átomos de carbono y también tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Se entenderá que en determinadas realizaciones, el heteroarilo puede ser ventajosamente de tamaño limitado tal como heteroarilo de 3 a 7 miembros, heteroarilo de 5 a 7 miembros y similares. El heteroarilo puede estar no sustituido o sustituido como se describe para alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento. Los grupos heteroarilo ilustrativos incluyen, pero

sin limitación, pirrolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, purinilo, tetrazolilo, triazinilo, pirazinilo, tetrazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, tienilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, benzoimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzoisoxazolilo, bencisotiazolilo y carbazoloilo, y similares.

5

Como se utiliza en el presente documento, "hidroxi" o "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.

Como se utiliza en el presente documento, "alcoxi" se refiere a un grupo tanto -O-(alquilo) como -O-(cicloalquilo no sustituido). Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, ciclopropiloxi, ciclobutiloxi, ciclopentiloxi, ciclohexiloxi, y similares.

10

Como se utiliza en el presente documento, "ariloxi" se refiere a un grupo -O-arilo u -O-heteroarilo. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, fenoxi, piridiniloxi, furaniloxi, tieniloxi, pirimidiniloxi, piraziniloxi, y similares, y similares.

15

Como se utiliza en el presente documento, "mercapto" se refiere a un grupo -SH.

Como se utiliza en el presente documento, "alquiltio" se refiere a un grupo -S-(alquilo) o -S-(cicloalquilo no sustituido). Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, metiltio, etiltio, propiltio, butiltio, ciclopropiltio, ciclobutiltio, ciclopentiltio, ciclohexiltio y similares.

20

Como se utiliza en el presente documento, "ariltio" se refiere a un grupo -S-arilo o -S-heteroarilo.

Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, feniltio, piridiniltio, furaniltio, tieniltio, pirimidiniltio y similares.

25

Como se utiliza en el presente documento, "halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

Como se utiliza en el presente documento, "trihalometilo" se refiere a un grupo metilo que tiene tres sustituyentes halo, tal como un grupo trifluorometilo.

30

Como se utiliza en el presente documento, "ciano" se refiere a un grupo -CN.

Como se utiliza en el presente documento, "sulfínilo" se refiere a un grupo -S(O)R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, o R" puede ser un grupo hidroxilo.

35

Como se utiliza en el presente documento, "sulfonilo" se refiere a un grupo -S(O)₂R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento, o R" puede ser un grupo hidroxilo.

40

Como se utiliza en el presente documento, "S-sulfonamido" se refiere a un grupo -S(O)₂NR"R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, "N-sulfonamido" se refiere a un grupo -NR"S(O)₂R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

45

Como se utiliza en el presente documento, "O-carbamilo" se refiere a un grupo -OC(O)NR"R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, "N-carbamilo" se refiere a un grupo R"OC(O)NR", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

50

Como se utiliza en el presente documento, "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo -OC(S)NR"R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

55

Como se utiliza en el presente documento, "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo R"OC(S)NR", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, "amino" se refiere a un grupo -NR"R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

60

Como se utiliza en el presente documento, "C-amido" se refiere a un grupo -C(O)NR"R", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, "N-amido" se refiere a un grupo R"C(O)NR", donde R" es cualquier grupo R como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento.

65

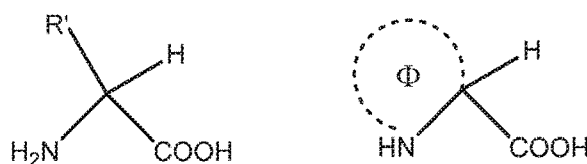
Como se utiliza en el presente documento, "nitro" se refiere a un grupo -NO_2 .

Como se utiliza en el presente documento, "enlace" se refiere a un enlace covalente.

Como se utiliza en el presente documento, "opcional" u "opcionalmente" significa que el hecho o circunstancia descrita a continuación puede, aunque no necesariamente, suceder y que la descripción incluye casos en los que el hecho o la circunstancia sucede y casos en los que no. Por ejemplo, "grupo heterociclo opcionalmente sustituido con un grupo alquilo" significa que el alquilo puede, pero no necesariamente, estar presente, y la descripción incluye situaciones en las que el grupo heterociclo está sustituido con un grupo alquilo y situaciones en las que el grupo heterociclo no está sustituido con el grupo alquilo.

Como se utiliza en el presente documento, "independientemente" significa que el hecho o circunstancia descrito a continuación debe leerse por sí solo en relación con otros hechos o circunstancias similares. Por ejemplo, en una circunstancia en la que varios grupos de hidrógeno equivalentes están opcionalmente sustituidos por otro grupo descrito en la circunstancia, el uso de "independientemente opcionalmente" significa que cada caso de un átomo de hidrógeno en el grupo puede estar sustituido por otro grupo, donde los grupos que reemplazan a cada uno de los átomos de hidrógeno pueden ser iguales o diferentes. O, por ejemplo, donde existen múltiples grupos, todos los cuales se pueden seleccionar de un conjunto de posibilidades, el uso de "independientemente" significa que cada uno de los grupos puede seleccionarse entre el conjunto de posibilidades separadas de cualquier otro grupo, y los grupos seleccionados según las circunstancias pueden ser iguales o diferentes.

Como se utiliza en el presente documento, "aminoácido" (también conocido como "AA") significa cualquier molécula que incluye un átomo de carbono alfa unido covalentemente a un grupo amino y un grupo ácido. El grupo ácido puede incluir un grupo carboxilo. "Aminoácido" puede incluir moléculas que tienen una de las fórmulas:



en donde R' es un grupo lateral y Φ incluye al menos 3 átomos de carbono. "Aminoácido" incluye estereoisómeros tales como las formas D-aminoácido y L-aminoácido. Los grupos de aminoácidos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los veinte aminoácidos humanos endógenos y sus derivados, tales como lisina (Lys), asparagina (Asn), treonina (Thr), serina (Ser), isoleucina (Ile), metionina (Met), prolina (Pro), histidina (His), glutamina (Gln), arginina (Arg), glicina (Gly), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala), valina (Val), fenilalanina (Phe), leucina (Leu), tirosina (Tyr), cisteína (Cys), triptófano (Trp), fosfoserina (PSER), sulfocisteína, ácido arginosuccínico (ASA), hidroxiprolina, fosfoetanolamina (PEA), sarcosina (SARC), taurina (TAU), carnosina (CARN), citrulina (CIT), anserina (ANS), 1,3-metil-histidina (ME-HIS), ácido alfa-amino-adípico (AAA), beta-alanina (BALA), etanolamina (ETN), ácido gamma-amino-butírico (GABA), ácido beta-amino isobutírico (BAIA), ácido alfa-aminobutírico (BABA), L-alocistationina (cistationina-A; CYSTA-A), L-cistationina (cistationina-B; CYSTA-B), cistina, alo-isoleucina (ALLO-ILE), DL-hidroxilisina (hidroxilisina (1)), DL-alo-hidroxilisina (hidroxilisina (2)), ornitina (ORNs. homocistina (HCY) y derivados de los mismos. En relación con las realizaciones descritas en el presente documento, los aminoácidos pueden unirse covalentemente a otras porciones de los conjugados descritos en el presente documento a través de sus grupos funcionales alfa-amino y carboxi (es decir, en una configuración de enlace peptídico), o a través de sus grupos funcionales de cadena lateral (tales como el grupo carboxi de cadena lateral en el ácido glutámico) y sus grupos funcionales alfa-amino o carboxi. Se entenderá que los aminoácidos, cuando se usan en conexión con los conjugados descritos en el presente documento, pueden existir como zwitteriones en un conjugado en el que están incorporados.

Como se utiliza en el presente documento, "profármaco" se refiere a un compuesto que puede administrarse a un sujeto en una forma farmacológicamente inactiva que luego puede convertirse en una forma farmacológicamente activa a través de un proceso metabólico normal, tal como la hidrólisis de una oxazolidina. Se entenderá que los procesos metabólicos a través de los cuales un profármaco puede convertirse en un fármaco activo incluyen, pero sin limitación, una o más reacciones químicas espontáneas, una o más reacciones catalizadas por enzima y/u otra(s) reacción(es) química(s) metabólica(s), o una combinación de las mismas. Se apreciará que se entiende que en la técnica se conocen diversos procesos metabólicos y los procesos metabólicos a través de los cuales los profármacos descritos en el presente documento se convierten en fármacos activos no son limitantes. Un profármaco puede ser un compuesto químico precursor de un fármaco que tiene un efecto terapéutico en un sujeto.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sujeto (es decir, un sistema tisular, animal o humano) que está buscando un investigador, un veterinario, un doctor en medicina u otro especialista clínico, que incluye, pero no se limita a, alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. En

un aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad de un activo que puede tratar o aliviar la enfermedad o los síntomas de la enfermedad con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad de un profármaco inactivo que, cuando se convierte mediante procesos metabólicos normales, produce una cantidad de fármaco activo capaz de provocar la respuesta biológica o medicinal en un sujeto que se busca.

También se aprecia que la dosis, ya sea que se refiera a monoterapia o terapia de combinación, se selecciona ventajosamente con referencia a cualquier toxicidad u otro efecto secundario indeseable, que podría producirse durante la administración de uno o más de los conjugados descritos en el presente documento. De forma adicional, se aprecia que las coterapias descritas en el presente documento pueden permitir la administración de dosis más bajas de conjugados que muestran dicha toxicidad u otro efecto secundario indeseable, donde esas dosis más bajas están por debajo de los umbrales de toxicidad o son más bajas en la ventana terapéutica que las que se administrarían de otro modo en ausencia de una coterapia.

Como se utiliza en el presente documento, "administrar" incluye todos los medios para introducir los conjugados y las composiciones descritos en el presente documento al animal hospedador, que incluyen, pero sin limitación, oral (po), intravenosa (iv), intramuscular (im), subcutánea (sc), transdérmica, por inhalación, bucal, ocular, sublingual, vaginal, rectal y similares. Los conjugados y las composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse en formas farmacéuticas unitarias y/o en formulaciones que contienen portadores, adyuvantes y/o vehículos convencionales no tóxicos y farmacéuticamente aceptables.

Como se usa en el presente documento, "composición farmacéutica" o "composición" se refiere a una mezcla de uno o más de los conjugados descritos en el presente documento, o sales, solvatos, hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos, con otros componentes químicos, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un conjugado a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro de conjugados como se describen y los métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Tales composiciones y métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 19a Edición (Mack Publishing Company, 1995).

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o pruebas de la presente invención, a continuación se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferentes.

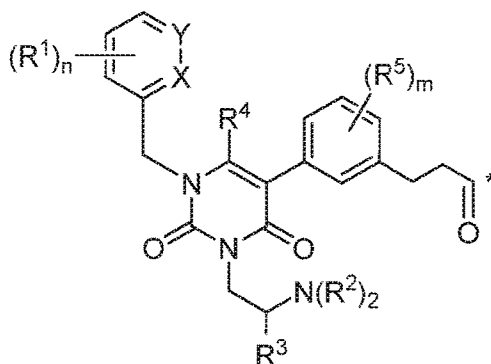
Descripción detallada

Varias realizaciones de la invención se describen en las siguientes cláusulas enumeradas y se contempla cualquier combinación de estas realizaciones con las realizaciones descritas en esta sección de Descripción detallada. Debe entenderse que los elementos y características de las diversas realizaciones representativas descritas a continuación pueden combinarse de diferentes maneras para producir nuevas realizaciones que también caen dentro del alcance de las presentes enseñanzas.

En cada una de las realizaciones anteriores y en cada una de las siguientes, debe entenderse que las fórmulas incluyen y representan no solamente todas las sales farmacéuticamente aceptables de los conjugados, sino también incluyen cualquiera y todos los hidratos y/o solvatos de las fórmulas conjugadas. Se aprecia que determinados grupos funcionales, tales como el hidroxilo, amino y grupos similares forman complejos y/o conjugados de coordinación con agua y/o diversos disolventes, en las diversas formas físicas de los conjugados. Por consiguiente, debe entenderse que las fórmulas anteriores incluyen y representan los diversos hidratos y/o solvatos. También debe entenderse que los no hidratos y/o no solvatos de las fórmulas conjugadas se describen mediante dicha fórmula, así como los hidratos y/o solvatos de las fórmulas conjugadas.

Se apreciará que los antagonistas de LHRH-R útiles en relación con la presente divulgación no están particularmente limitados por su estructura. Los antagonistas de LHRH-R útiles pueden ser cualquier fármaco o compuesto que muestre afinidad de unión por LHRH-R.

En algunas realizaciones, el antagonista de LHRH-R tiene la fórmula



en donde

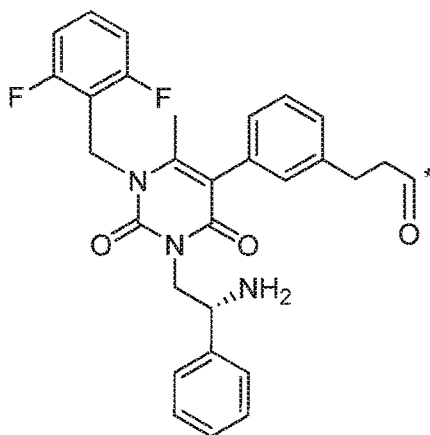
- 5 cada R^1 es independientemente halógeno, C_1-C_6 , alquilo o alquilo $-OC_1-C_6$; cada R^2 es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6 ; R^3 es alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{10} o alquilo C_1-C_6 -(arilo C_6-C_{10}); R^4 es alquilo C_1-C_6 ; cada R^5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo $-OC_1-C_6$, alquilo $-SC_1-C_6$ y arilo $-OC_6-C_{10}$; X e Y son cada uno independientemente N, CH o CR^1 ; siempre que
 10 entero de 0 a 3; y * representa un enlace covalente con L; L es un enlazador; y A es un fármaco o un agente de formación de imágenes; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, m es 0. En algunas realizaciones, m es 1. En algunas realizaciones, m es 2.

- En algunas realizaciones, R^1 , cuando está presente, es halógeno. En algunas realizaciones, R^3 , cuando está presente, es F. En algunas realizaciones, R^1 , cuando está presente, es Cl. En algunas realizaciones, R^1 , cuando está presente, es CH_3 . En algunas realizaciones, R^1 , cuando está presente, es $-OCH_3$. En algunas realizaciones, cada R^1 , cuando está presente, es F en las posiciones 2 y 6 del anillo al que cada R^1 está unido. En algunas realizaciones, cada R^1 , cuando está presente, es F en un patrón de sustitución para proporcionar un 2,6-difluorofenilo.

- En algunas realizaciones, R^2 es H. En algunas realizaciones, R^2 es $-CH_3$ en algunas realizaciones, R^3 es alquilo C_1-C_6 -(arilo C_6-C_{10}). En algunas realizaciones, R^3 es $-CH_2-C_6H_5$. En algunas realizaciones, R^3 es alquilo C_1-C_6 . En algunas realizaciones, R^3 es cicloalquilo C_3-C_6 . En algunas realizaciones, R^4 es metilo. En algunas realizaciones, cada R^5 , cuando está presente, es F, Cl, $-CH_3$, $-OCH_3$, $-OC_6H_5$ o $-SC_6H_5$. En algunas realizaciones, X es N e Y es CH. En algunas realizaciones, Y es N y X es CH. En algunas realizaciones, X es CR^1 e Y es CH o CR^1 . En algunas realizaciones, X es $-CF$ e Y es CH.

- 30 En algunas realizaciones, B es de la fórmula

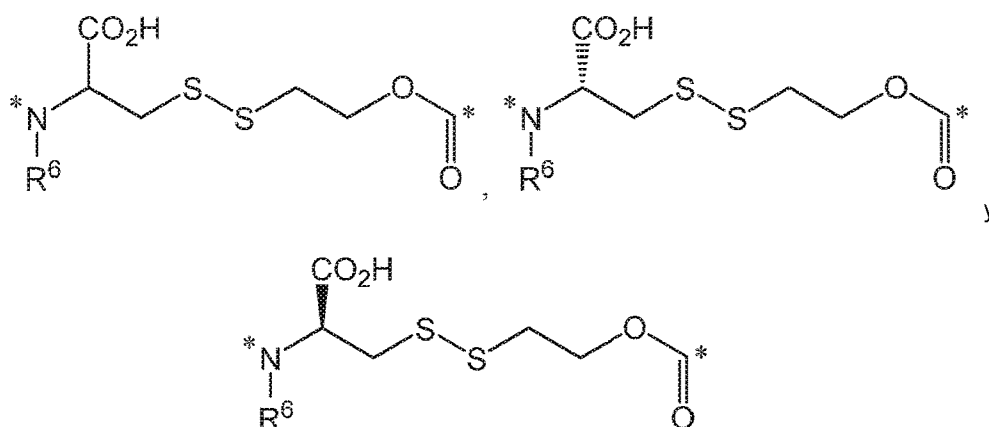


en donde * representa un enlace covalente con L.

- 35 Se apreciará que los enlazadores útiles en relación con la presente divulgación no están particularmente limitados por la estructura. Los enlazadores útiles pueden tener una amplia gama de estructuras y cualquier combinación de las partes del enlazador descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, el enlazador comprende un enlazador liberable donde la expresión "enlazador liberable" se refiere a un enlazador que incluye al menos un enlace que puede romperse en condiciones fisiológicas, tal como un enlace lábil al pH, lábil a ácidos, lábil a bases, oxidativamente lábil, metabólicamente lábil, bioquímicamente lábil o lábil enzimáticamente. Se aprecia que tales condiciones fisiológicas que resultan en la rotura del enlace no incluyen necesariamente un proceso biológico o metabólico, y en su lugar pueden incluir una reacción química estándar, tal como una reacción de hidrólisis, por ejemplo, a pH fisiológico, o como resultado de la compartimentación en un orgánulo celular tal como un endosoma que tiene un pH más bajo que el pH citosólico. En algunas realizaciones, el enlazador liberable comprende un enlace disulfuro.

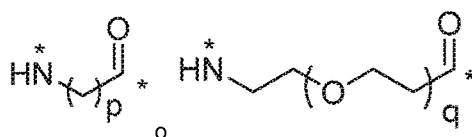
En algunas realizaciones, el enlazador comprende una porción seleccionada entre el grupo que consiste en



en donde R^6 es H o alquilo C_1-C_6 ; y

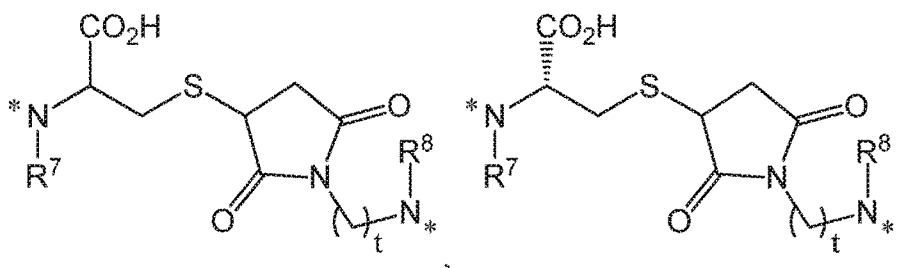
cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado.

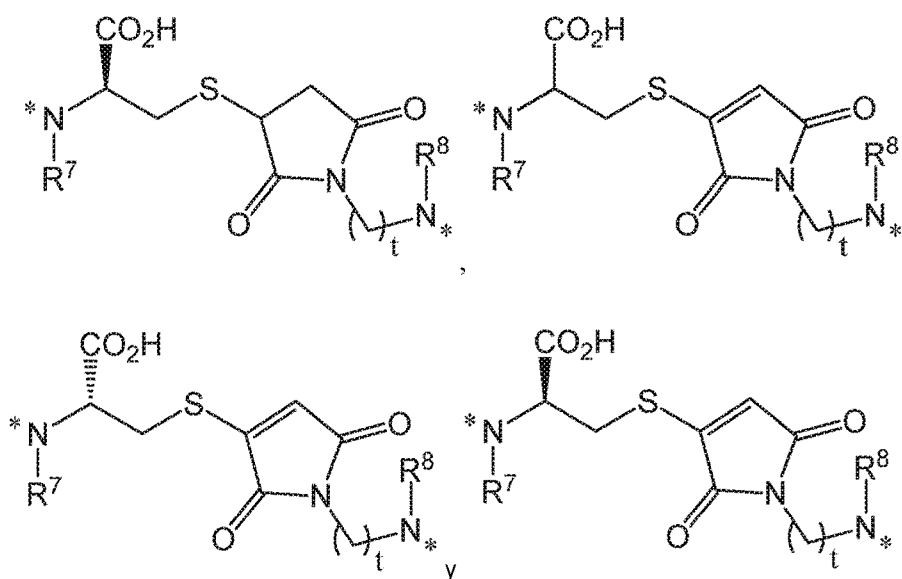
En algunas realizaciones, el enlazador comprende un resto de la fórmula



en donde p es un número entero de 3 a 10, q es un número entero de 3 a 100; y cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado.

En algunas realizaciones, el enlazador comprende una porción seleccionada entre el grupo que consiste en





5 en donde

cada uno de R^7 y R^8 es independientemente H o alquilo C_1-C_6 ;

t es un número entero de 1 a 8; y

10

cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado.

En algunas realizaciones, un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas incluye un agente de formación de imágenes, tal como un colorante de infrarrojo cercano (Near Infrared, NIR) o un agente de formación de imágenes radiactivo. Los compuestos representativos que pueden usarse como agentes de formación de imágenes de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen pero no se limitan a colorantes (por ejemplo, colorantes de rodamina, colorantes de cianina, colorantes de fluoresceína, etc.), agentes de formación de imágenes PET, agentes radiomarcados y similares. Los ejemplos representativos de colorantes de rodamina incluyen pero no se limitan a 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), rodamina B, rodamina 6G, TRITC, Rojo Texas, rodamina 123, sulforodamina 101 y similares. Los ejemplos de colorantes de fluoresceína incluyen pero no se limitan a fluoresceína, 5-amino-fluoresceína, 6-amino-fluoresceína, isocianato de fluoresceína (FITC), NHS-fluoresceína, Verde Oregón, Verde Tokio, Verde Singapur, Verde Filadelfia y similares. Los colorantes representativos del infrarrojo cercano que pueden usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen pero no se limitan a LS288, IR800, SP054, S0121, KODAK, IRD28, S2076, S0456 y derivados de los mismos.

25

En algunas realizaciones, puede usarse un agente radiomarcado como un agente de formación de imágenes de acuerdo con las presentes enseñanzas. En algunas realizaciones, puede marcarse isotópicamente un colorante de rodamina o un colorante de fluoresceína. Ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los conjugados incluyen isótopos de hidrógeno (por ejemplo, 2H y 3H), carbono (por ejemplo, ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C), cloro (por ejemplo, ^{36}Cl), flúor (por ejemplo, ^{18}F), yodo (por ejemplo, ^{123}I y ^{125}I), nitrógeno (por ejemplo, ^{13}N y ^{15}N), oxígeno (por ejemplo, ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O), fósforo (por ejemplo, ^{32}P) y azufre (por ejemplo, ^{35}S).

30

Determinados conjugados marcados isotópicamente, por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radiactivo, pueden ser útiles en estudios de distribución tisular de fármaco y/o sustrato. Los isótopos radioactivos tritio (es decir, 3H) y carbono-14 (es decir, ^{14}C) son particularmente útiles para este fin a la vista de su facilidad de incorporación y medios de detección disponibles.

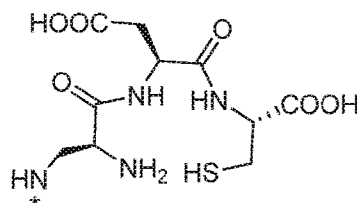
35

La sustitución con isótopos de emisión de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F y ^{13}N , puede resultar útil en estudios de Topografía de Emisión de Positrones (Positron Emission Topography, PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Los conjugados marcados isotópicamente pueden prepararse generalmente por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia o por procesos análogos a aquellos descritos en los Ejemplos adjuntos usando un reactivo apropiado marcado isotópicamente en lugar del reactivo no marcado empleado anteriormente.

40

En algunas realizaciones, A es un isótopo radiactivo, tal como un isótopo radiactivo de un metal, coordinado a un grupo quelante. En algunas realizaciones, el grupo quelante de la fórmula

45



en donde * representa un enlace covalente con el resto del conjugado.

- 5 En algunas realizaciones, el grupo quelante comprende un isótopo metálico radiactivo seleccionado entre el grupo que consiste en un isótopo de tecnecio, renio, galio, gadolinio, indio y cobre coordinados con el mismo. En algunas realizaciones, el conjugado comprende un isótopo metálico radiactivo seleccionado entre el grupo que consiste en ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga coordinados con el mismo.
- 10 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para la formación de imágenes de una población de células o tejidos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Se apreciará que tales métodos *in vitro* pueden llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, los métodos de formación de imágenes *in vitro* descritos en el presente documento pueden incluir (a) poner en contacto una población de células con un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas que es adecuado para la formación de imágenes para
- 15 proporcionar el conjugado unido a células que expresan una proteína LHRH-R y (b) visualizar el conjugado unido a células por irradiación con luz. Se apreciará que visualizar el conjugado unido a células por irradiación con luz puede incluir irradiación a una longitud de onda de excitación y detección a una longitud de onda de emisión. De este modo, en algunas realizaciones, los métodos de formación de imágenes *in vitro* descritos en el presente documento pueden incluir (a) poner en contacto una población de células con un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas que sea adecuado para la formación de imágenes para proporcionar el conjugado unido a células que expresan una proteína LHRH-R, (b) irradiar el conjugado unido a células que expresan una proteína LHRH-R con una luz de longitud
- 20 de onda de excitación y (c) detectar la luz emitida por las células cancerosas en una longitud de onda de emisión.
- En algunas realizaciones, los tejidos, tales como tumores cancerosos, pueden formarse imágenes de acuerdo con los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos de formación de imágenes *in vivo* de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden incluir (a) administrar al paciente un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas que sea adecuado para la formación de imágenes; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para proporcionar el conjugado unido a células que expresan una proteína LHRH-R; y (b) visualizar el conjugado unido a células que expresan una proteína LHRH-R mediante irradiación con luz. Se apreciará que visualizar el conjugado unido a células por irradiación con luz puede incluir irradiación a una longitud de onda de excitación y detección a una longitud de onda de emisión. De este modo, en algunas realizaciones, los métodos de formación de imágenes *in vivo* descritos en el presente documento pueden incluir (a) administrar al paciente un conjugado como se describe en el presente documento que sea adecuado para la formación de imágenes; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para proporcionar el conjugado unido a células que expresan una
- 30 proteína LHRH-R; (b) irradiar el conjugado unido a células que expresan una proteína LHRH-R con una luz de longitud de onda de excitación; y (c) detectar la luz emitida por las células cancerosas en una longitud de onda de emisión. Se apreciará que la visualización del conjugado unido a las células mediante irradiación con luz puede llevarse a cabo usando cualquier técnica de formación de imágenes conocida (de diagnóstico o de otro tipo) o instrumentación conocida en la técnica.
- 40 En algunas realizaciones, un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas incluye un agente terapéutico que, en algunas realizaciones, es terapéuticamente eficaz contra las células cancerosas y/o los fibroblastos asociados al cáncer (CAF). El agente terapéutico usado de acuerdo con las presentes enseñanzas puede ser cualquier molécula capaz de modular o modificar de otro modo la función celular, incluyendo compuestos farmacéuticamente activos (por ejemplo, un agente terapéutico) o cualquier molécula capaz de proporcionar una señal medible para obtener imágenes o células o tejidos visualizados (por ejemplo, un agente de formación de imágenes).
- 45

Las moléculas adecuadas que pueden ser útiles como agentes terapéuticos incluyen pero no se limitan a péptidos, oligopéptidos, oligopéptidos retroinversos, proteínas, proteína, análogos en los que al menos un enlace no peptídico reemplaza un enlace peptídico, apoproteínas, glucoproteínas, enzimas, coenzimas, inhibidores de enzimas, aminoácidos y sus derivados, receptores y otras proteínas de membrana; antígenos y anticuerpos contra los mismos; haptenos y anticuerpos contra los mismos; hormonas, lípidos, fosfolípidos, liposomas; toxinas; antibióticos; analgésicos; broncodilatadores; beta-bloqueantes; agentes antimicrobianos; agentes antihipertensores; agentes cardiovasculares incluyendo antiarrítmicos, glucósidos cardíacos, antianginosos y vasodilatadores; agentes del sistema nervioso central incluyendo estimulantes, psicotrópicos, antimaníacos y depresivos; agentes antivíricos; antihistamínicos; fármacos contra el cáncer incluyendo agentes quimioterapéuticos; tranquilizantes; antidepresivos; antagonistas de H-2; anticonvulsivos; antináuseas; prostaglandinas y análogos de prostaglandinas; relajantes musculares; sustancias antiinflamatorias; estimulantes; descongestivos; antieméticos; diuréticos; antiespasmódicos;

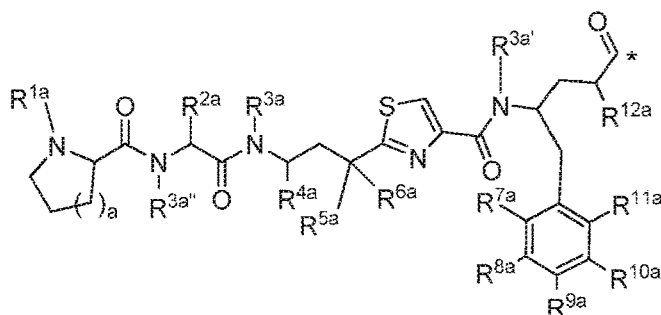
50

55

antiasmáticos; agentes antiparkinsonianos; expectorantes; supresores de la tos; mucolíticos; y aditivos minerales y nutricionales.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede ser una tubulicina. Las tubulinas naturales son generalmente tetrapéptidos lineales que consisten en ácido *N*-metil pipercolico (Mep), isoleucina (Ile), un aminoácido no natural llamado tubuvalina (Tuv) y cualquiera de un aminoácido no natural llamado tubutirosina (Tut, un análogo de la tirosina) o un aminoácido no natural llamado tubufenilalanina (Tup, un análogo de la fenilalanina).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un tetrapéptido de fórmula



en donde R^{1a} , R^{3a} , $R^{3a'}$ y $R^{3a''}$ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 y cicloalquilo C_3-C_6 , en donde cada átomo de hidrógeno en alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 y cicloalquilo C_3-C_6 está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 , C_3-C_6 , cicloalquilo, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} , heteroarilo de 5 a 7 miembros, $-OR^{13a}$, $-OC(O)R^{13a}$, $-OC(G)NR^{13a}R^{13a'}$, $-OS(O)R^{13a}$, $-OS(O)_2R^{13a}$, $-SR^{13a}$, $-SC(O)R^{13a}$, $-S(O)R^{13a}$, $-S(O)_2R^{13a}$, $-S(O)_2OR^{13a}$, $-S(O)NR^{13a}R^{13a'}$, $-S(O)_2NR^{13a}R^{13a'}$, $-OS(O)NR^{13a}R^{13a'}$, $-OS(O)_2NR^{13a}R^{13a'}$, $-NR^{13a}R^{13a'}$, $-NR^{13a}C(O)R^{14a}$, $-NR^{13a}C(O)OR^{14a}$, $-NR^{13a}C(O)NR^{14a}R^{14a'}$, $-NR^{13a}S(O)R^{14a}$, $-NR^{13a}S(O)_2R^{14a}$, $-NR^{13a}S(O)NR^{14a}R^{14a'}$, $-NR^{13a}S(O)_2NR^{14a}R^{14a'}$, $-P(O)(OR^{13a})_2$, $-C(O)R^{13a}$, $-C(O)OR^{13a}$ o $-C(O)NR^{13a}R^{13a'}$,

R^{2a} , R^{4a} y R^{12a} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, C_1-C_6 , alquilo, alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 ;

R^{5a} y R^{6a} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 , $-OR^{15a}$, $-SR^{15a}$ y $-NR^{15a}R^{15a'}$, en donde cada átomo de hidrógeno en alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 y alquinoilo C_2-C_6 está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, $-OR^{16a}$, $-SR^{16a}$, $-NR^{16a}R^{16a'}$, $-C(O)R^{16a}$, $-C(O)OR^{16a}$ o $-C(O)NR^{16a}R^{16a'}$, o R^{3a} y R^{6a} tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un $-C(O)-$;

cada R^{7a} , R^{8a} , R^{9a} , R^{10a} y R^{11a} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 , $-CN$, $-NO_2$, $-NCO$, $-OR^{17a}$, $-SR^{17a}$, $-S(O)_2OR^{17a}$, $-NR^{17a}R^{17a'}$, $-P(O)(OR^{17a})_2$, $-C(O)R^{17a}$, $-C(O)OR^{17a}$ y $-C(O)NR^{17a}R^{17a'}$, en donde cada átomo de hidrógeno en alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 y alquinoilo C_2-C_6 está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, $-OR^{18a}$, $-SR^{18a}$, $-NR^{18a}R^{18a'}$, $-C(O)R^{18a}$, $-C(O)OR^{18a}$ o $-C(O)NR^{18a}R^{18a'}$;

cada R^{13a} , $R^{13a'}$, R^{14a} , $R^{14'}$, R^{15a} , $R^{15'}$, R^{16a} , $R^{16a'}$, R^{17a} y $R^{17a'}$ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} y heteroarilo de 5 a 7 miembros, en donde cada átomo de hidrógeno en alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} o heteroarilo de 5 a 7 miembros está opcionalmente sustituido independientemente con halógeno, $-OH$, $-SH$, $-NH_2$ o $-CO_2H$;

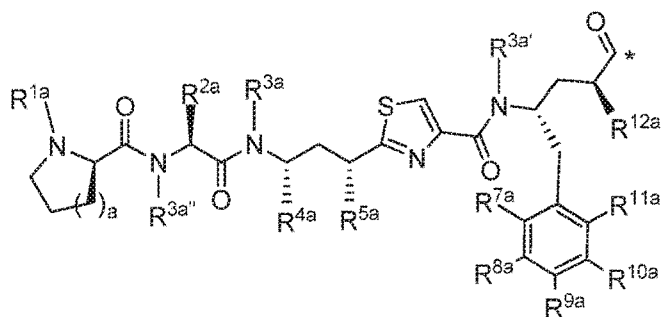
cada R^{18a} y $R^{18a'}$ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} , heteroarilo de 5 a 7 miembros, $-C(O)R^{19a}$, $-P(O)(OR^{19a})_2$ y $-S(O)_2OR^{19a}$;

cada R^{19} se selecciona independientemente de H, alquilo C_1-C_6 , alquenoilo C_2-C_6 , alquinoilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} y heteroarilo de 5 a 7 miembros;

a es 1, 2 o 3; y

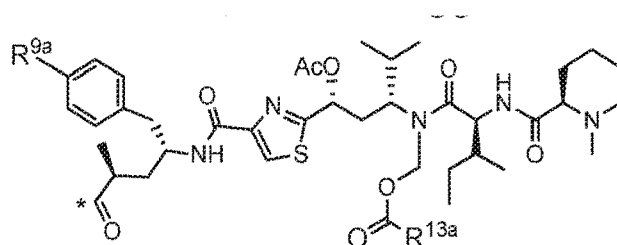
* representa un enlace covalente al resto del conjugado.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es de fórmula



en donde R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , $R^{3a'}$, $R^{3a''}$, R^{4a} , R^{5a} , R^{7a} , R^{8a} , R^{9a} , R^{10a} , R^{11a} y R^{12a} son como se describen en el presente documento y * representa un enlace covalente al resto del conjugado.

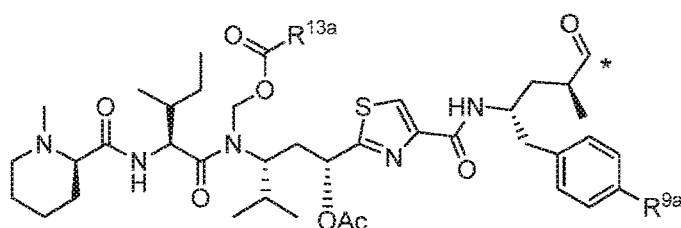
En otra realización, el agente terapéutico puede ser una tubulisina de origen natural o un análogo o derivado de la misma, de la siguiente fórmula general



en donde R^{9a} y R^{13a} son como se describen en el presente documento y * representa un enlace covalente al resto del conjugado.

Los conjugados de cada una de las tubulisinias anteriores se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede ser una tubulisina de origen natural de la siguiente fórmula general



Factor	R^{13a}	R^{9a}
A	$(CH_3)_2CHCH_2$	OH
B	$CH_3(CH_2)_2$	OH
C	CH_3CH_2	OH
D	$(CH_3)_2CHCH_2$	H
E	$CH_3(CH_2)_2$	H
F	CH_2CH_3	H
G	$(CH_3)_2C=CH$	OH
H	CH_3	H
I	CH_3	OH

y * representa un enlace covalente al resto del conjugado

En algunas realizaciones, los métodos de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden usarse tanto para medicina clínica humana como para aplicaciones veterinarias como un "sujeto". De este modo, a un "sujeto" se le pueden

administrar los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas y puede ser humano ("paciente") o, en el caso de aplicaciones veterinarias, puede ser un animal de laboratorio, agrícola, doméstico o salvaje. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente humano, un animal de laboratorio tal como un roedor (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, etc.), un conejo, un mono, un chimpancé, animales domésticos tales como perros, gatos y conejos, animales agrícolas tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras y animales salvajes en cautiverio tales como osos, pandas, leones, tigres, leopardos, elefantes, cebras, jirafas, gorilas, delfines y ballenas.

En algunas realizaciones, los cánceres descritos en el presente documento pueden ser una población de células cancerosas que es tumorigénica, incluyendo tumores benignos y tumores malignos, o el cáncer puede ser no tumorigénico. El cáncer puede surgir espontáneamente o mediante procesos tales como mutaciones presentes en la línea germinal del paciente o mutaciones somáticas, o el cáncer puede estar inducido por vía química, por vía vírica o por radiación. Los cánceres aplicables a las presentes enseñanzas incluyen pero no se limitan a un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, un melanoma, un mesotelioma, un carcinoma nasofaríngeo, una leucemia, un adenocarcinoma y un mieloma.

En algunas realizaciones, los cánceres pueden ser cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza, cáncer del cuello, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer de endometrio, leiomiomasarcoma, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, leucemia crónica, leucemia aguda, linfomas linfocíticos, mesotelioma pleural, cáncer de la vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer del uréter, cáncer del riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, tumores de la médula espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, colangiocarcinoma, cáncer tiroideo de células de Hurthle o adenocarcinoma de la unión gastroesofágica.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se proporcionan sales farmacéuticamente aceptables de conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas. Las sales farmacéuticamente aceptables de conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen sales de adición de ácidos y de bases de los mismos.

Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos ilustrativos incluyen, entre otros, sales acetato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzoato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato-bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de hidrógeno/fosfato de dihidrógeno, sacarato, estearato, succinato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

Las sales básicas adecuadas de los conjugados descritos en el presente documento se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos ilustrativos incluyen, entre otros, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y sales de cinc. También pueden formarse hemisales de ácidos o bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio.

En algunas realizaciones, los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden administrarse como una formulación en asociación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos pueden ser excipientes. La elección del vehículo puede depender de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del vehículo sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro de conjugados como se describen en el presente documento y los métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Tales composiciones y métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 21a Edición* (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

En algunas realizaciones, un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, y combinaciones de los mismos, que sean fisiológicamente compatibles. En algunas realizaciones, el vehículo es adecuado para la administración parenteral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios a las composiciones de la invención.

En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas pueden incluir suspensiones y soluciones. Tales formulaciones pueden comprender un vehículo, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. También pueden prepararse formulaciones líquidas mediante la reconstitución de un sólido.

- En algunas realizaciones, una suspensión acuosa puede contener los materiales activos mezclados con excipientes apropiados. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica; agentes dispersantes o humectantes que pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina; un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, por ejemplo, estearato de polioxietileno; un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol; un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol; o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, ácido ascórbico, etilo, n-propilo o p-hidroxibenzoato; o uno o más agentes colorantes.
- En algunas realizaciones, polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición, de agua proporcionan el principio activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los excipientes adicionales, por ejemplo, agentes colorantes, también pueden estar presentes.
- Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábica o goma de tragacanto; fosfátidos de origen natural, por ejemplo, lecitina de soja; y ésteres incluyendo ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitano.
- En algunas realizaciones, los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico pueden incluirse en la composición. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede facilitarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.
- Los formatos ilustrativos para administración oral incluyen pero no se limitan a comprimidos, cápsulas, elixires, jarabes y similares.
- Dependiendo del tipo de cáncer como se describe en el presente documento, la vía de administración y/o si los conjugados se administran local o sistémicamente, en el presente documento se contempla un amplio intervalo de dosificaciones permitidas, incluyendo dosis que caen en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 1 g/kg. Las dosificaciones pueden ser únicas o divididas y pueden administrarse de acuerdo con una amplia diversidad de protocolos, incluyendo q.d., b.i.d., t.i.d. o incluso cada dos días, quincenalmente (b.i.w.), una vez a la semana, una vez al mes, una vez por trimestre y similares. En cada uno de estos casos se entiende que las cantidades terapéuticamente eficaces descritas en el presente documento corresponden a la instancia de administración, o alternativamente a la dosis total diaria, semanal, mensual o trimestral, según lo determine el protocolo de dosificación.
- En algunas realizaciones, un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas puede administrarse directamente en el torrente sanguíneo, en un músculo o en un órgano interno. Las rutas adecuadas para dicha administración parenteral incluyen administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, epidural, intracerebroventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intratumoral, intramuscular y subcutánea. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.
- En algunas realizaciones, las formulaciones parenterales son normalmente soluciones acuosas que pueden contener vehículos o excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tampón (preferentemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril apirógena. En otras realizaciones, cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento puede adaptarse para la administración parenteral de los conjugados descritos en el presente documento. La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, por liofilización en condiciones estériles, puede lograrse fácilmente usando técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la solubilidad de un conjugado como se describe en el presente documento usado en la preparación de una formulación parenteral puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes mejoradores de la solubilidad.
- En algunas realizaciones, las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para liberación inmediata y/o modificada. En algunas realizaciones, los principios activos de acuerdo con las presentes enseñanzas (es decir, los conjugados descritos en el presente documento) pueden administrarse en una formulación de liberación prolongada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los principios activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el conjugado contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico,

colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y poliláctico, copolímeros poliglicólicos (PGLA). Los métodos para la preparación de dichas formulaciones se conocen generalmente por los expertos en la materia. En otras realizaciones, los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas o las composiciones que comprenden los conjugados pueden administrarse de forma continua, cuando sea apropiado.

En algunas realizaciones, se proporciona un kit. Si va a administrarse una combinación de conjugados activos como se describe en el presente documento, pueden combinarse dos o más composiciones farmacéuticas en forma de un kit adecuado para la administración secuencial o coadministración de las composiciones. Un kit de este tipo puede incluir dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos uno de los cuales contiene un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas, y medios para retener por separado las composiciones, tales como un recipiente, una botella dividida o un paquete de aluminio dividido. En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden uno o más conjugados como se describe en el presente documento, se proporcionan en recipientes que tienen marcadores que proporcionan instrucciones para el uso de los conjugados como se describe en el presente documento para la selección y/o tratamiento del paciente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "kit" se refiere a un conjunto de materiales que se usan para realizar un método de acuerdo con las presentes enseñanzas. Los componentes del kit pueden proporcionarse en combinación empaquetada en el mismo o en recipientes separados, dependiendo de sus reactividades cruzadas y estabildades, y en forma líquida o sólida. Las cantidades y proporciones de los componentes proporcionados en el kit pueden seleccionarse para proporcionar resultados óptimos para una aplicación particular. Mientras que en algunas realizaciones, los componentes a administrar (por ejemplo, a un paciente) pueden proporcionarse en formas físicas separadas (por ejemplo, un kit que contiene una o más composiciones y uno o más líquidos), ha de entenderse que en otras realizaciones, todos los componentes que van a introducirse al paciente pueden proporcionarse juntos en una forma física común (por ejemplo, una composición o un líquido).

Los componentes incluidos en los kits de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden suministrarse en todo tipo de recipientes de tal manera que las actividades de los diferentes componentes se conserven sustancialmente, mientras que los propios componentes no se adsorban ni se alteren sustancialmente por los materiales del recipiente. Los recipientes adecuados incluyen pero no se limitan a ampollas, frascos, tubos de ensayo, viales, matraces, jeringas, bolsas y sobres (por ejemplo, forrados con papel de aluminio) y similares. Los recipientes pueden estar formados por cualquier material adecuado que incluye pero no limitado a vidrio, polímeros orgánicos (por ejemplo, policarbonato, poliestireno, polietileno, polipropileno, etc.), cerámica, metal (por ejemplo, aluminio), aleaciones metálicas (por ejemplo, acero), corcho y similares. Además, los recipientes pueden contener uno o más puertos de acceso (por ejemplo, para acceso mediante una aguja), tales como el que puede proporcionar un tabique. Los materiales preferidos para tabiques incluyen caucho y polímeros que incluyen pero no limitado a, por ejemplo, politetrafluoroetileno del tipo vendido con el nombre comercial TEFLON por DuPont (Wilmington, Del.). Además, los recipientes pueden contener dos o más compartimentos separados por tabiques o membranas que pueden retirarse para permitir la mezcla de los componentes.

Los kits de acuerdo con las presentes enseñanzas también pueden suministrarse con otros artículos conocidos en la técnica y/o que puedan ser deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo, pero sin limitaciones, instrucciones para añadir los componentes del kit a un sistema de intercambio de calor.

Los materiales de instrucción proporcionados con kits de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden imprimirse (por ejemplo, en papel) y/o suministrarse en un medio legible electrónicamente (por ejemplo, disquete, CD-ROM, DVD ROM, disco zip, cinta de vídeo, cinta de audio, etc.). Como alternativa, las instrucciones pueden proporcionarse dirigiendo a un usuario a un sitio web de Internet (por ejemplo, especificado por el fabricante o distribuidor del kit) y/o a través de correo electrónico, mensaje de texto, redes sociales y/o similares y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes descritos anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Normalmente, las dispersiones se preparan incorporando el conjugado en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión y cualquier ingrediente adicional de los descritos anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente filtrada de forma estéril, o los ingredientes pueden filtrarse de forma estéril juntos.

La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. En algunas realizaciones, la fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

Puede usarse cualquier régimen eficaz para administrar los conjugados descritos en el presente documento. Por

ejemplo, los conjugados descritos en el presente documento pueden administrarse como dosis individuales o las dosis pueden dividirse y administrarse como un régimen diario de múltiples dosis. De forma adicional, un régimen escalonado, por ejemplo, de uno a cinco días por semana, puede usarse como alternativa al tratamiento diario, y para los fines de los métodos descritos en este documento, dicho régimen diario intermitente o escalonado se considera equivalente al tratamiento diario y está contemplado. En algunas realizaciones, el paciente se trata con múltiples inyecciones de un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, al paciente se le inyecta múltiples veces (por ejemplo, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 veces) un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas, por ejemplo, en intervalos de 1:2-72 horas o en intervalos de 48-72 horas. Pueden administrarse al paciente inyecciones adicionales de un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas en un intervalo de días o meses después de la inyección o inyecciones iniciales y las inyecciones adicionales pueden prevenir la reaparición del cáncer.

Puede usarse cualquier transcurso de terapia adecuado con los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas. En algunas realizaciones, se seleccionan dosis individuales y regímenes de dosificación para proporcionar una dosis total administrada durante un mes de aproximadamente 15 mg. En algunos ejemplos, un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas se administra en una única dosis diaria administrada cinco días a la semana, en las semanas 1, 2 y 3 de cada ciclo de 4 semanas, sin dosis administrada en la semana 4. En un ejemplo alternativo, un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas se administra en una única dosis diaria administrada tres días a la semana, de las semanas 1 y 3 de cada ciclo de 4 semanas, sin dosis administrada las semanas 2 y 4. En un ejemplo alternativo, se administra un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas quincenalmente las semanas 1 y 2 (es decir, los días 1, 4, 8, 11, de un ciclo de 3 semanas). En un ejemplo alternativo, se administra un conjugado descrito en el presente documento una vez por semana las semanas 1 y 2 (es decir, los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas).

La dosificación diaria unitaria de los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas puede variar significativamente dependiendo de la afección del paciente, el cáncer que se está tratando, la vía de administración de los conjugados descritos en el presente documento y la distribución en los tejidos, y la posibilidad de uso conjunto de otros tratamientos terapéuticos, tal como radioterapia o fármacos adicionales en terapias combinadas. La cantidad eficaz que debe administrarse a un paciente se basa en la superficie corporal, la masa y la evaluación médica de la condición del paciente. Las dosis terapéuticamente eficaces (también denominadas en el presente documento "cantidades terapéuticamente eficaces") pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 20,0 mg/m².

Los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden contener uno o más centros quirales, o pueden de otro modo ser capaces de existir como múltiples estereoisómeros. Por consiguiente, debe entenderse que la presente invención incluye estereoisómeros puros así como mezclas de estereoisómeros, tales como enantiómeros, diastereómeros y mezclas enantiomérica o diastereoméricamente enriquecidas. Los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden ser capaces de existir como isómeros geométricos. Por consiguiente, debe entenderse que la presente invención incluye isómeros geométricos puros o mezclas de isómeros geométricos.

Se aprecia que los conjugados de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y están incluidas dentro del alcance de la presente invención. Los conjugados descritos en el presente documento pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y están destinadas a estar dentro del alcance de la presente invención.

En algunas realizaciones, las composiciones y/o formas de dosificación para la administración de un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas se preparan a partir de un conjugado con una pureza de al menos aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 %, o aproximadamente el 99,5 %. En otras realizaciones, las composiciones y/o las formas de dosificación para la administración de un conjugado de acuerdo con las presentes enseñanzas se preparan a partir de un conjugado con una pureza de al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 96 %, o al menos el 97 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 %, o al menos el 99,5 %.

En algunas realizaciones, el fármaco puede ser cisplatino, disorazol, un inhibidor de ERK, un inhibidor de PI3K/ERK o gemcitabina.

Los ligandos dirigidos a moléculas pequeñas pueden poseer varias ventajas en comparación con los péptidos y anticuerpos, que incluyen, entre otras: i) estabilidad en un amplio intervalo de pH y temperatura, lo que los hace más factibles para el radiomarcado específico del sitio, ii) alta penetración tumoral y farmacocinética favorable, iii) eliminación rápida y iv) no inmunogenicidad. El uso de un antagonista de molécula pequeña no peptídico para LHRH-R para desarrollar conjugados de colorantes de infrarrojo cercano dirigidos a LHRH-R puede superar los inconvenientes del uso de ligandos dirigidos a un péptido, tal como la absorción inespecífica por parte de los receptores eliminadores en el hígado y el riñón, inestabilidad de los péptidos en circulación, etc.

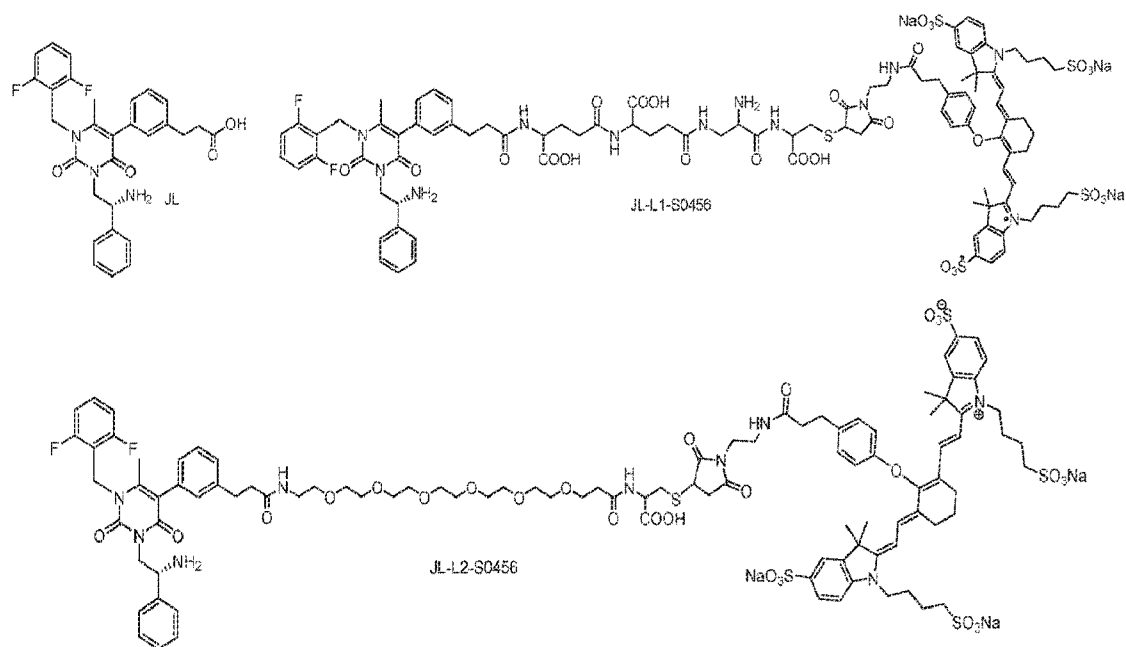
Los siguientes ejemplos y procedimientos representativos ilustran características de acuerdo con las presentes enseñanzas y se proporcionan únicamente a modo de ilustración. No pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

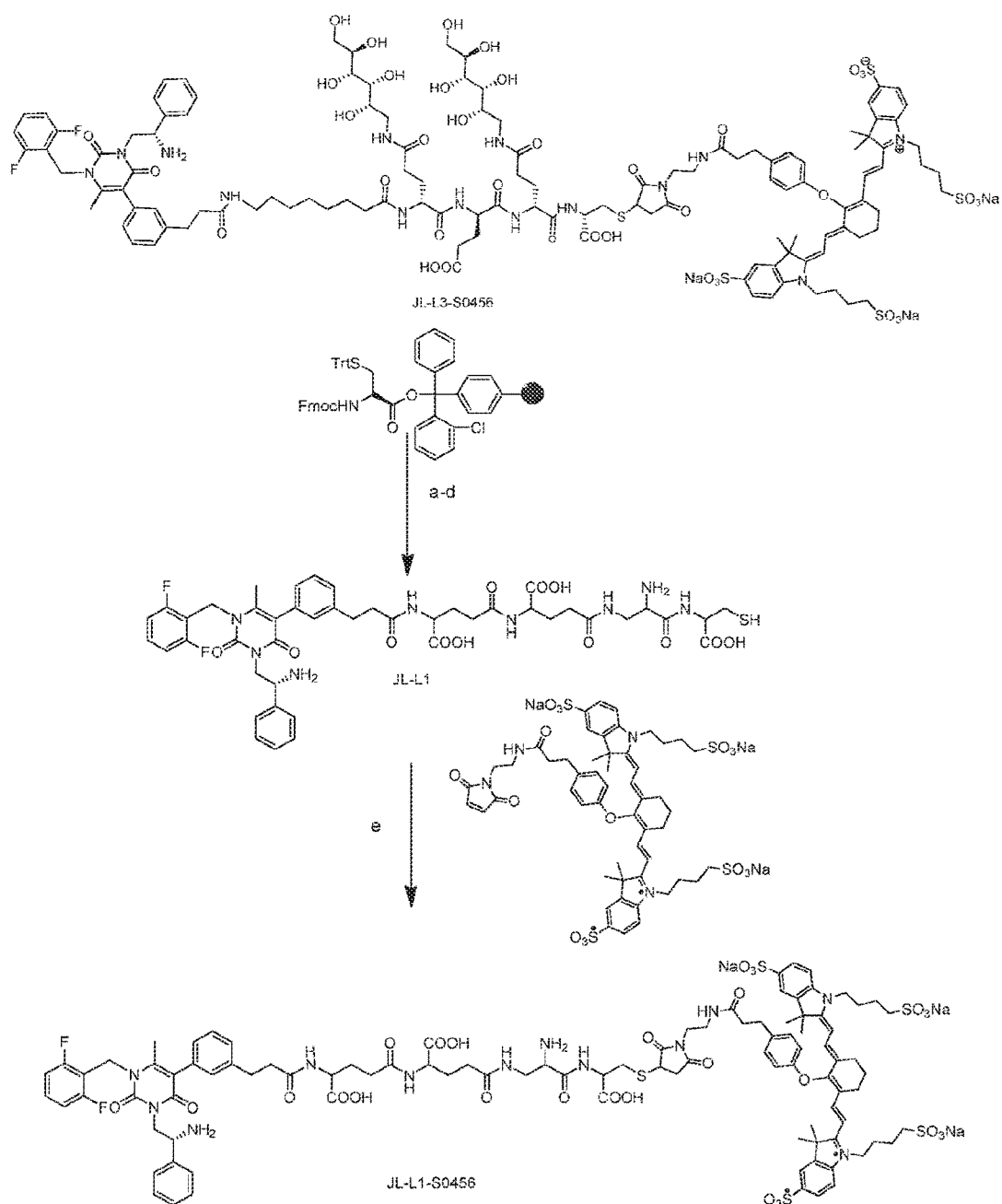
- 5 Los materiales, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBop), *N,N*-Dimetilmetanamida (DMF), -hexafluorofosfato de (1*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio metanamio (HATU), *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (DIPEA), alcohol isopropílico (IPA) diclorometano (DCM) y ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-etanoditiol, triisopropilsilano (TIPS), piperidina, dimetilsulfóxido (DMSO) y todos los demás reactivos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los reactivos de cultivo celular, tal como medio 1640 del Rosewell Park Memorial
- 10 Institute (RPMI 1640) y suero bovino fetal (FBS), se adquirieron en GIBCO (Grand Island, Nueva York), mientras que penicilina-estreptomina al 1 %, glutamina 2 mM se obtuvieron de Life Technologies. ^{99m}Tc-pertecnetato de sodio fue adquirido por Syncor. La resina H-Cys(Trt)-2-Cl-Trt y los aminoácidos protegidos se adquirieron de Chem-Impex Intl. (Chicago, IL). Tubulicina B hidrazida y su derivado activado fue un amable regalo de Endocyte Inc, (West Lafayette, IN). La glutamina, penicilina-estreptomina y la tripsina se adquirieron de BD Biosciences (San José, CA).

15

Ejemplos de compuestos

Compuesto del ejemplo 1. JL-L1-S0456, JL-L2-S0456, JL-L3-S0456



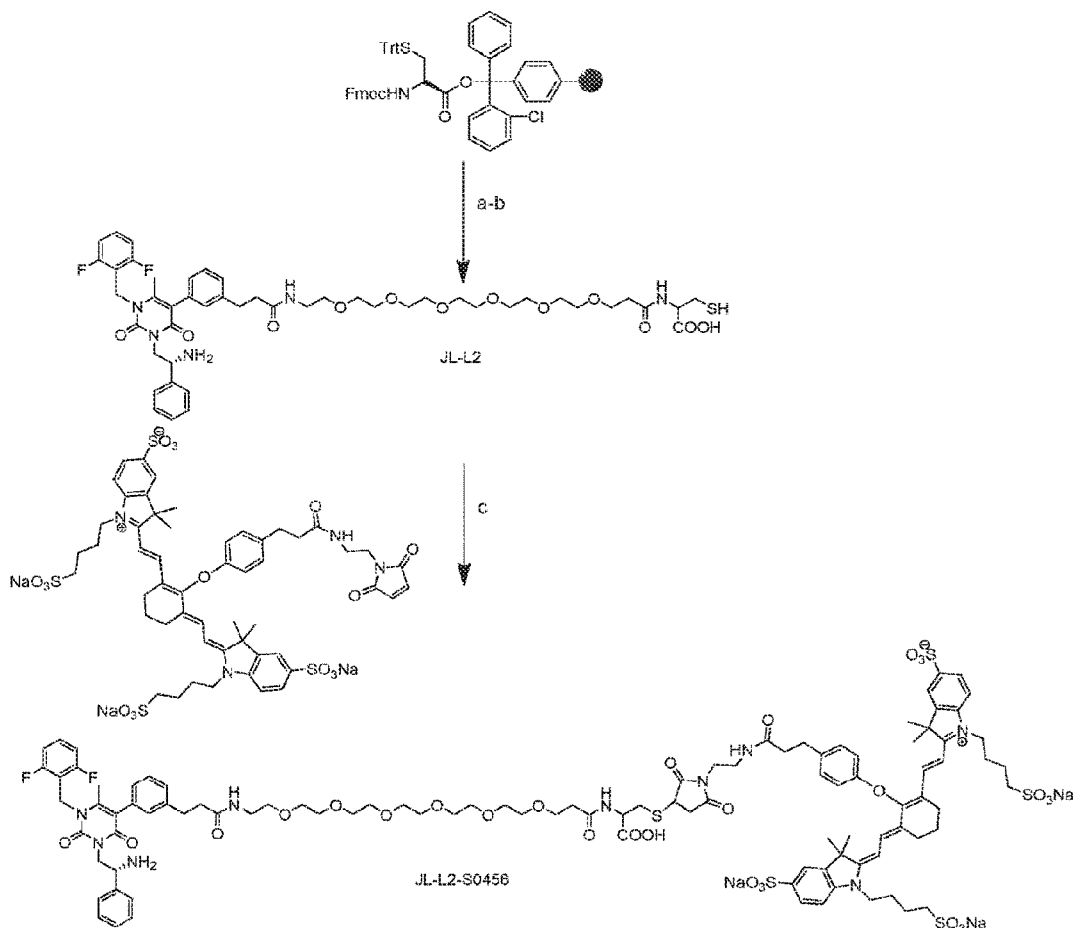


Esquema 1. Síntesis de JR-L1-S0456, Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) Ácido Fmoc-diaminopropiónico (DAP), PyBop, DMF, DIPEA, (b) (i) piperidina al 20 %/DMF, ta, 10 min (ii) éster alfa-*terc*-butílico de ácido N-Fmoc-L-glutámico, PyBop, DMF, DIPEA, (c) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) éster alfa-*terc*-butílico de ácido N-Fmoc-L-glutámico, PyBop, DMF, DIPEA, (d) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) JL, PyBop, DMF, DIPEA, (iii) TFA/H₂O/TIPS/EDT (92,5:2,5:2,5:2,5), 1 hora, (e) JL-L1, S0456 maleimida, DMSO anhidro. DIPEA, ta.

Síntesis de JL-L1: El ligando de LHRH-R se sintetizó según los métodos descritos en Tucci, F. C., *et al.* (2005). Journal of medicinal chemistry, 48(4), 1169-1178 y Struthers. R. S., *et al.* (2007) Endocrinology. 148(2), 857-867. Por la simplicidad de la conjugación, el grupo éter presente en la molécula publicada se modificó para tener un grupo ácido carboxílico. El ligando de LHRH-R modificado se denomina JL. Como se describe en el Esquema 1, el enlazador se preparó mediante la síntesis peptídica en fase sólida convencional. Después se acopló JL al enlazador en la fase sólida. El producto final se separó de la resina H-Cys(Trt)2-clorotritilo usando la solución cóctel convencional de TFA: Agua/TIPS: Etanoditiol (95 %: 2,5 %: 2,5 %: 2,5 %). El JL-L1 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H] calcd. para C₁₅H₅₆F₂N₅O₁₃, 1027; encontrado 1028.

Síntesis del conjugado NIR JL-L1-S0456: El colorante S0456 que contenía maleimida se sintetizó como se describe

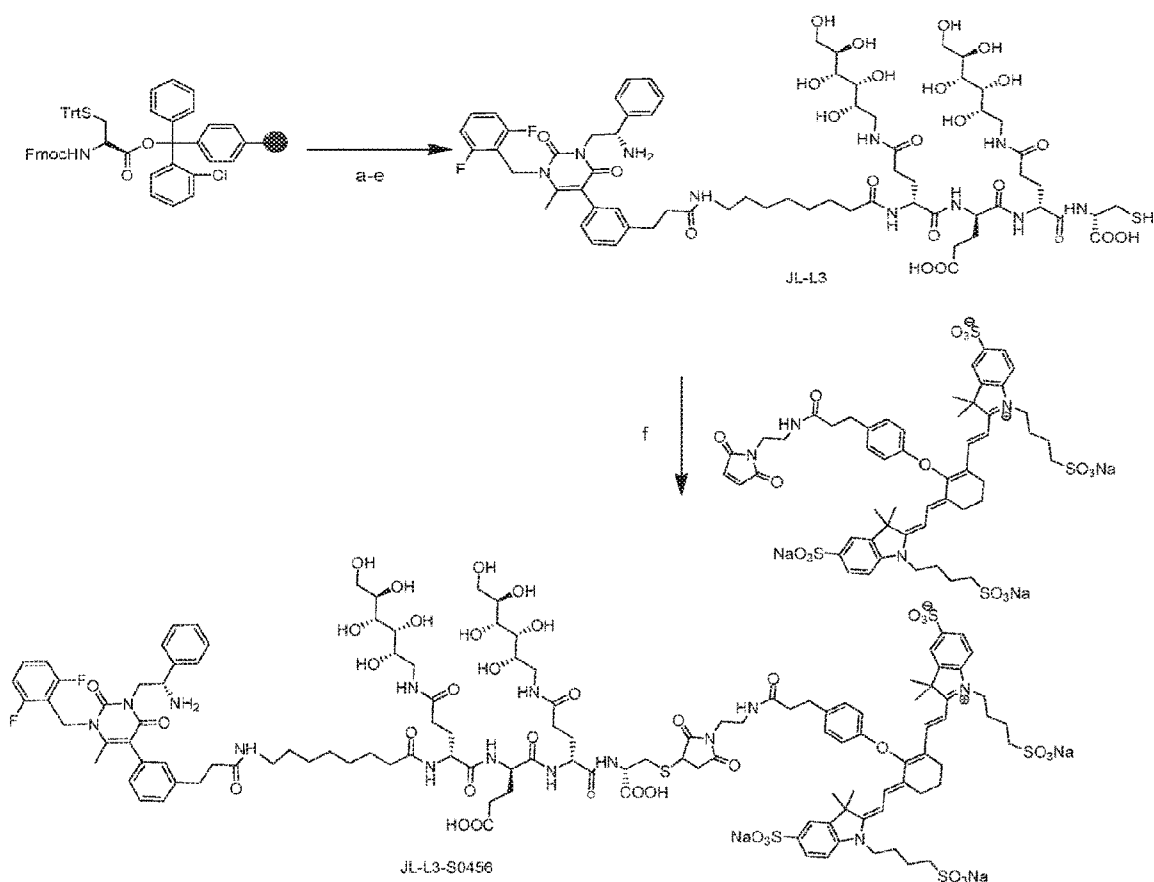
en el Esquema 1. Se disolvieron 1 equivalencia de S0456-maleimida y JL-L1 en DMSO anhidro, seguido de la adición de 5 equivalencias de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante 1 hora. La finalización de la reacción se monitorizó mediante CL-EM. El JL-L1-S0456 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 7,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. La caracterización CLEM de JL-L1-S0456 fue la siguiente. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calcd. para C₈₉H₉₉F₂N₁₀Na₃O₂₂S₃, 1863; encontrado 1864. El trazo de LRMS-CL/EM de JR-L1-S0456 se muestra en la figura 1.



Esquema 2. Síntesis de JL-L2-S0456, Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) ácido Fmoc-N-amido-dPEGg, PyBop, D.MF, DEPEA, (b) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta 10 min (ii) JL, PyBop, DMF, DIPEA, (iii) TFA/H₂O/TIPS/EDT (92,5:2,5:2,5:2,5), 1 hora, (c) JL-L2, S0456 maleimida, DMSO anhidro, DIPEA, ta.

Síntesis de JL-L2: Como se describe en el Esquema 2, el enlazador se preparó mediante la síntesis peptídica en fase sólida convencional. Después se acopló JL al enlazador en la fase sólida. El producto final se separó de la resina H-Cys(Trt)2-clorotritilo usando la solución cóctel convencional de TFA:Agua:TIPS: Etanoditiol (95 %: 2,5 %: 2,5 %: 2,5 %). El JL-L2 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. LRMS-LCZMS (m/z): [M+H]⁺ calc. para C₄₇H₆₁F₂N₅O₁₂S, 958,08; encontrado 959.

Síntesis del conjugado NIR JL-L2-S0456: El colorante S0456 que contenía maleimida se sintetizó como se describe en el Esquema 2. Se disolvieron 1 equivalencia de S0456-maleimida y JL-L2 en DMSO anhidro, seguido de la adición de 5 equivalencias de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante 1 hora. La finalización de la reacción se monitorizó mediante CL-EM. El JL-L2-S0456 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 7,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. JL-L3 S0456 se sintetizaron y purificaron mediante el mismo procedimiento que JL-L1-S0456. La caracterización CLEM de JL-L2-S0456 fue la siguiente. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calcd. para C₁₀₀H₁₁₈F₂N₉Na₃O₂₈S₅, 2161.35; encontrado 2162. El trazo de LRMS-CL/EM de JR-L2-S0456 se muestra en la figura 2.

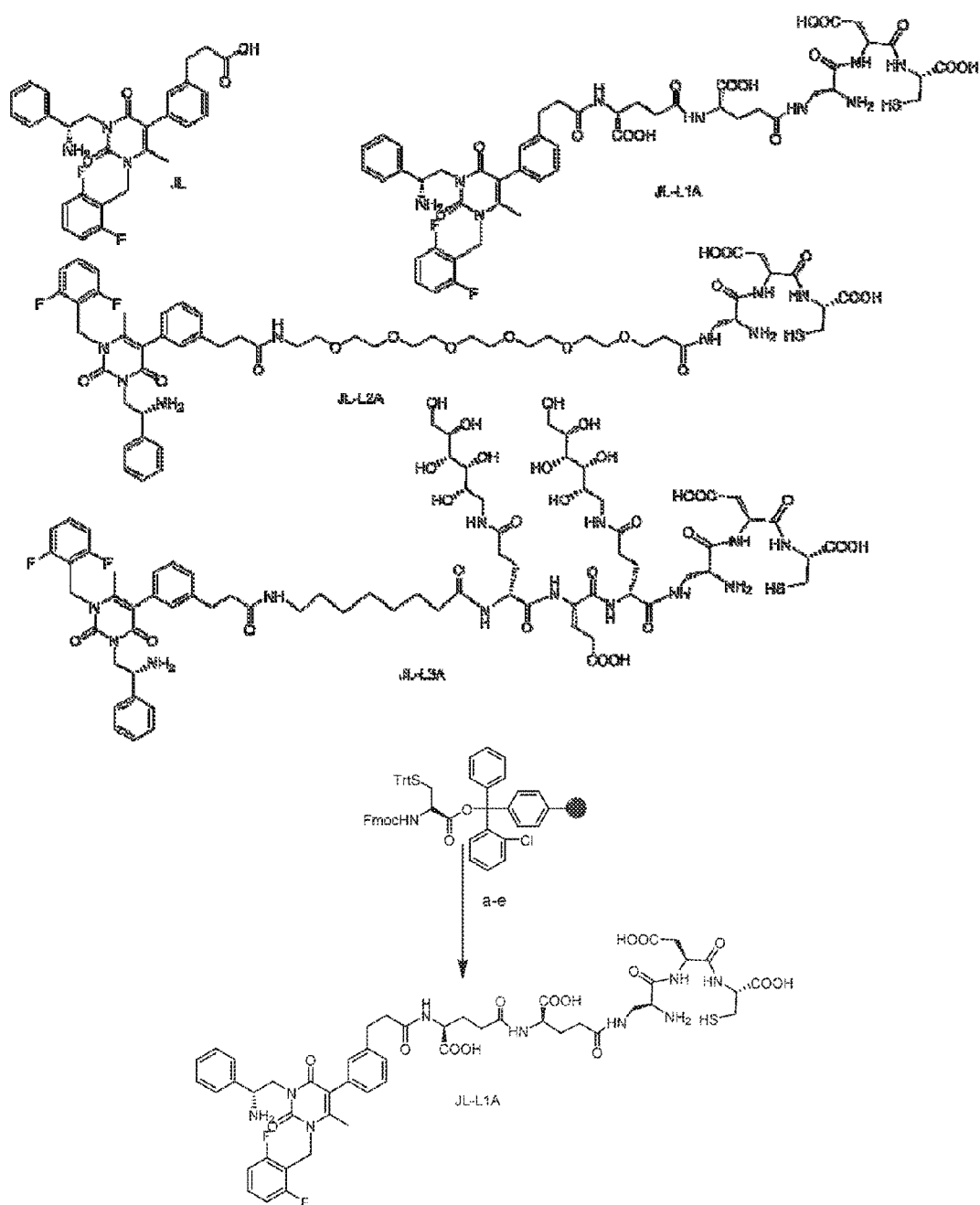


- 5 Esquema 3. Síntesis de JL-L3-S0456, Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) 3,4,5,6-di-isopropiliden-1-amino-desoxi(Fmoc-Glu-OH)-D-glucitol, PyBop, DMF, DIPEA, (b) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) Fmoc-Glu(OtBu)-OH, PyBop, DMF, DIPEA, (c) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) 3,4,5,6-di-isopropiliden-1-amino-desoxi(Fmoc-Glu-OH)-D-glucitol, PyBop, DMF, DIPEA, (d) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) ácido Fmoc-8-amino-octanoico, PyBop, DMF, DIPEA, (e) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) JL, PyBop, DMF, DIPEA, (iii) TFA/H₂O/TIPS/EDT (92,5:2,5:2,5:2,5), 1 hora, (f) JL-L2, S0456 maleimida, DMSO anhidro, DIPEA, ta.

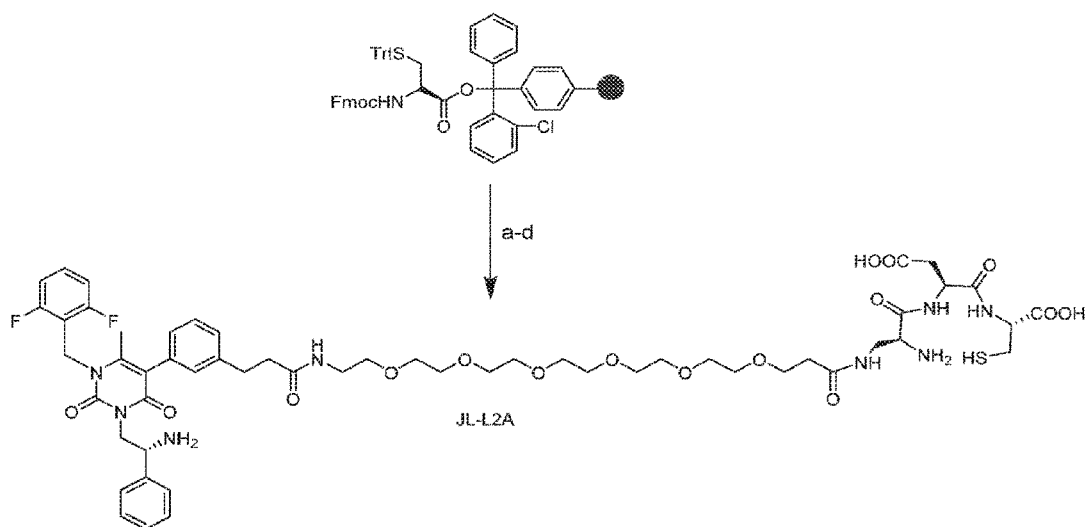
Síntesis de JL-L3: Como se describe en el Esquema 3, el enlazador se preparó mediante la síntesis peptídica en fase sólida convencional. La subunidad de peptidoglucano se sintetizó como se describe en cualquier otro sitio. Después se acopló JL al enlazador en la fase sólida. El producto final se separó de la resina H-Cys(Trt)2-clorotritilo usando la solución cóctel convencional de TFA:Agua:TIPS: Etanoditiol (95 %: 2,5 %: 2,5 %: 2,5 %). El JL-L3 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calc. para C₆₇H₉₄F₂N₁₀O₂₃S, 1477; encontrado 1478.

Síntesis del conjugado NIR JL-L3-S0456: El colorante S0456 que contenía maleimida se sintetizó como se describe en el Esquema 3. Se disolvieron 1 equivalencia de S0456-maleimida y JL-L3 en DMSO anhidro, seguido de la adición de 5 equivalencias de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante 1 hora. La finalización de la reacción se monitorizó mediante CL-EM. El JL-L3-S0456 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 7,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. La caracterización LCMS de JL-L3-S0456 fue la siguiente. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calcd. para C₁₂₀H₁₅₁F₂N₁₄Na₃O₃₉S₅, 2680.85; encontrado 2682. El trazo de LRMS-CL/EM de JR-L3-S0456 se muestra en la figura 3.

Compuesto del ejemplo 2. JL-L1A, JL-L2A, JL-L3A

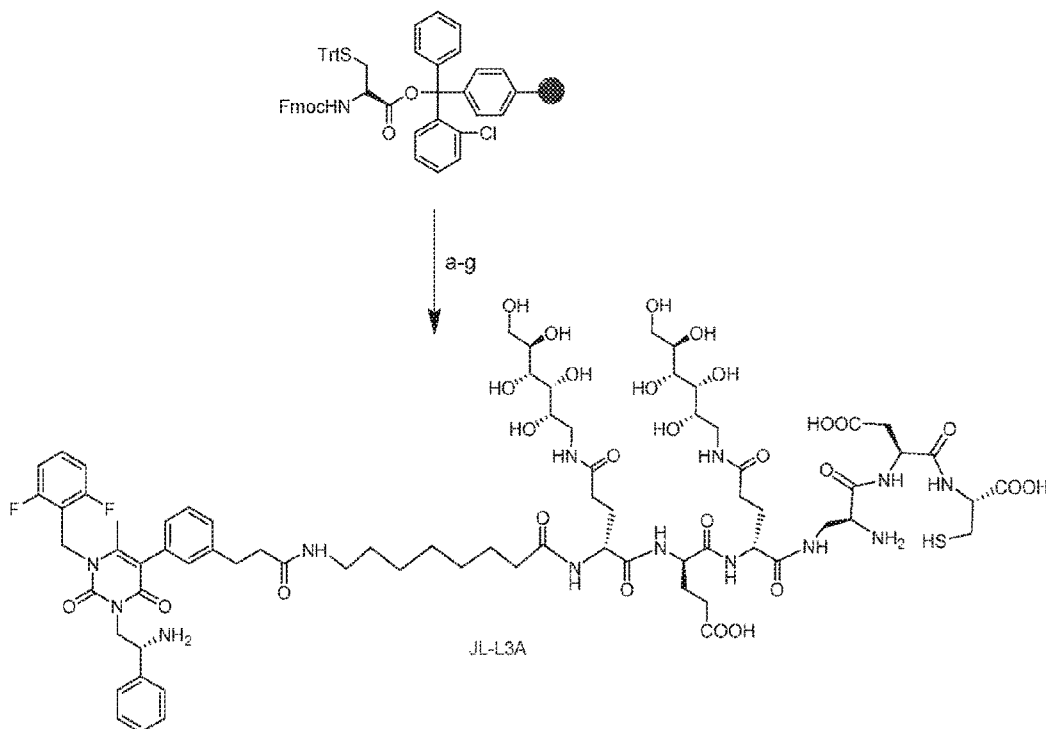


Síntesis de JL-L1A. El ligando dirigido a LHRH-R se sintetizó según el procedimiento publicado en Tucci, F. C., *et al.* Journal of medicinal chemistry, 48(4), 1169-1178. La molécula original se modificó para reemplazar la funcionalidad éter de la molécula con un grupo de ácido carboxílico. El ligando modificado se denomina en el presente documento JL. La síntesis de todos los conjugados se realizó mediante síntesis peptídica en fase sólida estándar. Los componentes del conjugado se construyeron sobre la resina H-Cys(Trt)2-clorotritilo. La solución cóctel convencional de TFA:Agua:TIPS:Etanoditiol (95 %: 2,5 %: 2,5 %) se usó para escindir el conjugado final de la resina. El producto bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calcd. para C₄₉H₅₇F₂N₉O₁₅S. 1082,1; encontrado 1083.



Esquema 5. Síntesis de JL-L2A, Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) Fmoc-Asp(OtBu), PyBop, DMF, DIPEA, (b) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) ácido Fmoc-diaminopropiónico (DAP), PyBop, DMF, DIPEA. (c) (i) 20 % de piperidinaZDMF, ta, (ii) ácido Fmoc-N-amido-dPEG₆, PyBop, DMF, DIPEA, (d) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) JL, PyBop, DMF, DIPEA, (iii) TFA-H₂O/TIPS/EDT (92,5:2,5:2,5:2,5), 1 hora.

Síntesis de JL-L2A. El ligando dirigido a LHRH-R se sintetizó según el procedimiento publicado en Tucci, F. C., *et al.* Journal of medicinal chemistry, 48(4), 1169-1178. La molécula original se modificó para reemplazar la funcionalidad éter de la molécula con un grupo de ácido carboxílico. El ligando modificado se denomina en el presente documento JL. La síntesis de todos los conjugados se realizó mediante síntesis peptídica en fase sólida estándar. Los componentes del conjugado se construyeron sobre la resina H-Cys(Trt)2-clorotritilo. La solución cóctel convencional de TFA:Agua:TIPS:Etanoditiol (95 %: 2,5 %: 2,5 %: 2,5 %) se usó para escindir el conjugado final de la resina. El producto bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. LRMS-LCZMS (m/z): [M+H]⁺ calc. para C₅₄H₇₂F₂N₈O₁₅S, 1159,27; encontrado 1160.



Esquema 6. Síntesis de JL-L3 A, Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) Fmoc-Asp(OtBu), PyBop, DMF, DIPEA, (b) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) ácido Fmoc-diaminopropiónico (DAP), PyBop, DMF, DIPEA, (c) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) 3,4,5,6-di-isopropiliden-1-amino-desoxi(Fmoc-Glu-OH)-D-glucitol, PyBop,

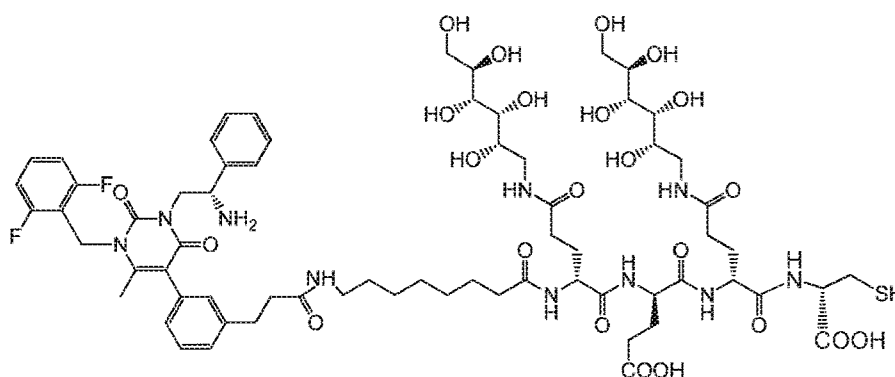
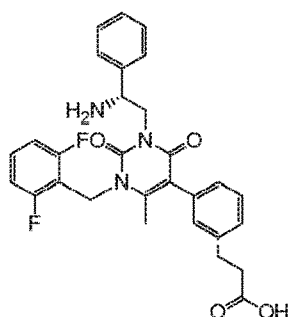
DMF, DIPEA, (d) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) éster alfa-*tert*-butilico de ácido N-Fmoc-L-glutámico, PyBop, DMF, DIPEA, (e) (i) piperidina al 20 %/DMF, ta, (ii) 3,4,5,6-di-isopropiliden-1-amino-desoxi(Fmoc-Glu-OH)-D-glucitol PyBop, DMF, DIPEA, (f) (i) piperidina al 20 %/DMF, ta, 10 min (ii) ácido Fmoc-8-amino-octanoico, PyBop, DMF, DIPEA, (e) (i) piperidina al 20 %/DMF, ta, 10 min, (g)) (i) piperidina al 20 %/DMF, ta, 10 min (ii) JL, PyBop, DMF, DIPEA, (iii) TFA/H₂O/TIPS/EDT (92,5:2,5:2,5:2,5), 1 hora.

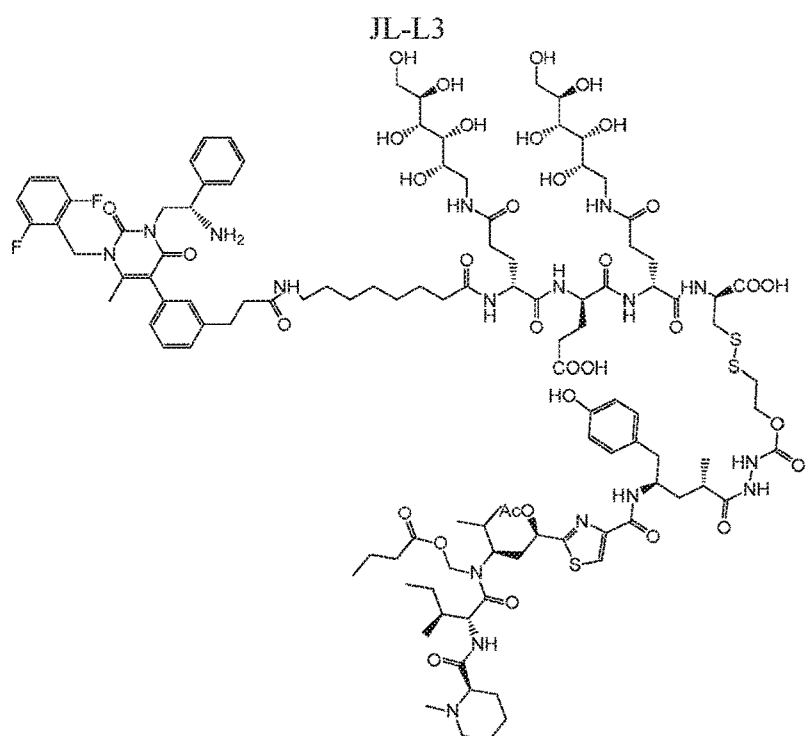
Síntesis de JL-L3A. El ligando dirigido a LHRH-R se sintetizó según el procedimiento publicado en Tucci, F. C., *et al.* Journal of medicinal chemistry, 48(4), 1169-1178. La molécula original se modificó para reemplazar la funcionalidad éter de la molécula con un grupo de ácido carboxílico. El ligando modificado se denomina en el presente documento JL. La síntesis de todos los conjugados se realizó mediante síntesis peptídica en fase sólida estándar. Los componentes del conjugado se construyeron sobre la resina H-Cys(Trt)2-clorotritilo. La solución cóctel convencional de TFA:Agua:TIPS:Etanoditioil (95 %: 2,5 %: 2,5 %: 2,5 %) se usó para escindir el conjugado final de la resina. El producto bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir el producto requerido. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calc. para C₇₄H₁₀₅F₂N₁₃O₂₇S, 1678,77; encontrado 1678. El perfil de HPLC radiactivo JL-L3A se muestra en la figura 4.

Formulación de viales JL-L1A, JL-L2A y JL-L3A no radiactivos. Antes del radiomarcaje con ^{99m}Tc, los conjugados se formularon según el procedimiento publicado en Leamon, C. P., *et al.* Bioconjugate chemistry, 13(6), 1200-1210. Los 0,1 mg de JL-L1A, 80 mg de α-D-glucoheptonato sódico y 10 mg de clorhidrato de estaño (II), se disolvieron en agua purgada con argón. El pH de la solución se ajustó a 6,8 ± 0,2 con hidróxido sódico o ácido clorhídrico. El volumen final se ajustó a 10 ml y después se transfirió a 10 viales que contenían 1 ml cada uno de la solución anterior y se liofilizó. El polvo liofilizado se selló en los viales en argón y se almacenó a -20 °C. Se siguió el mismo procedimiento para formular JL-L2A y JL-L3A.

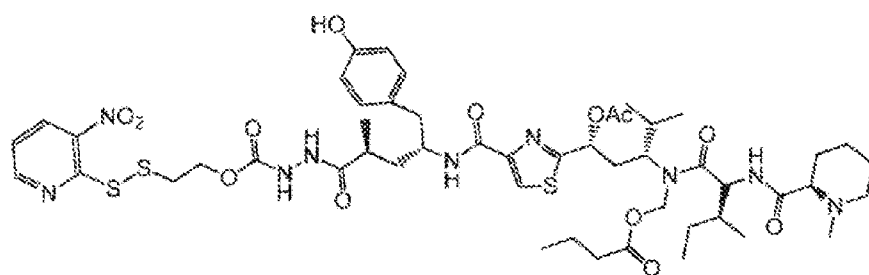
Marcaje con ^{99m}Tc de JL-L1A, JL-L2A y JL-L3A. El radiomarcaje de los conjugados se realizó según el procedimiento publicado en Leamon, C. P., *et al.* Bioconjugate chemistry, 13(6), 1200-1210. A un vial formulado de JL-L1A se le añadió 1 ml de pertechnetato sódico ^{99m}Tc y se calentó durante ~ 18 min a 100 °C. La solución quelada se enfrió a temperatura ambiente antes de usarla para estudios *in vitro* e *in vivo*. La efectividad de quelación de los conjugados se confirmó mediante HPLC. Los tres conjugados mostraron más del 95 % de eficiencia de quelación.

Compuesto del ejemplo 3. JL-L2-rodamina, JR-L3, JR-L3-TubBH

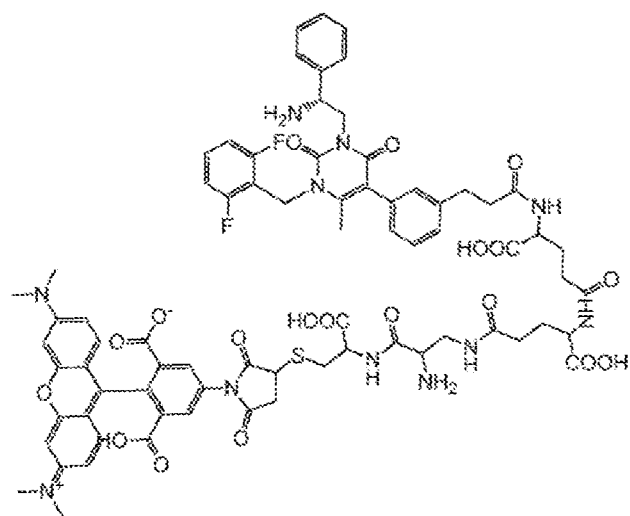




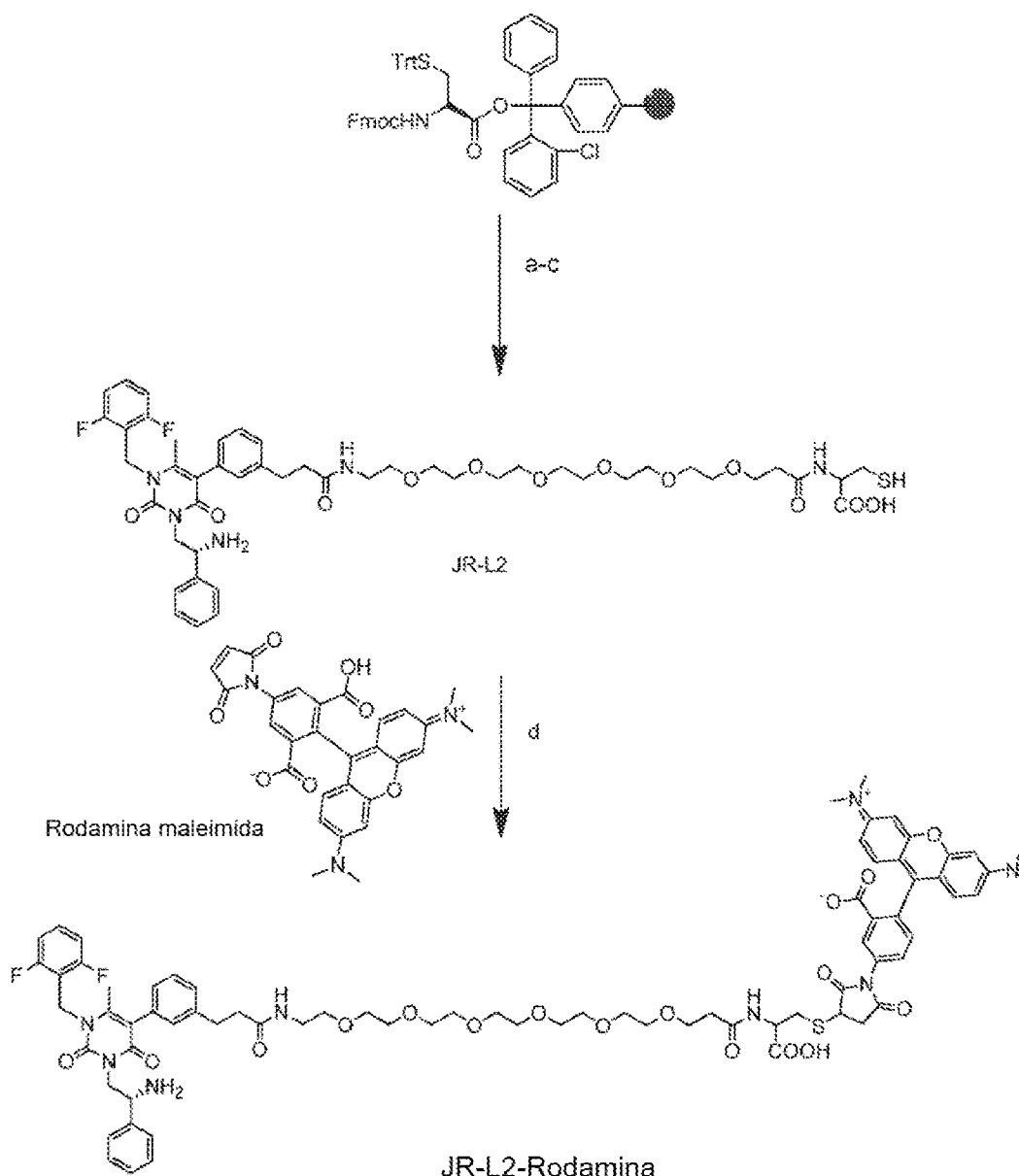
JL-L3-TubBH



TubBH libre



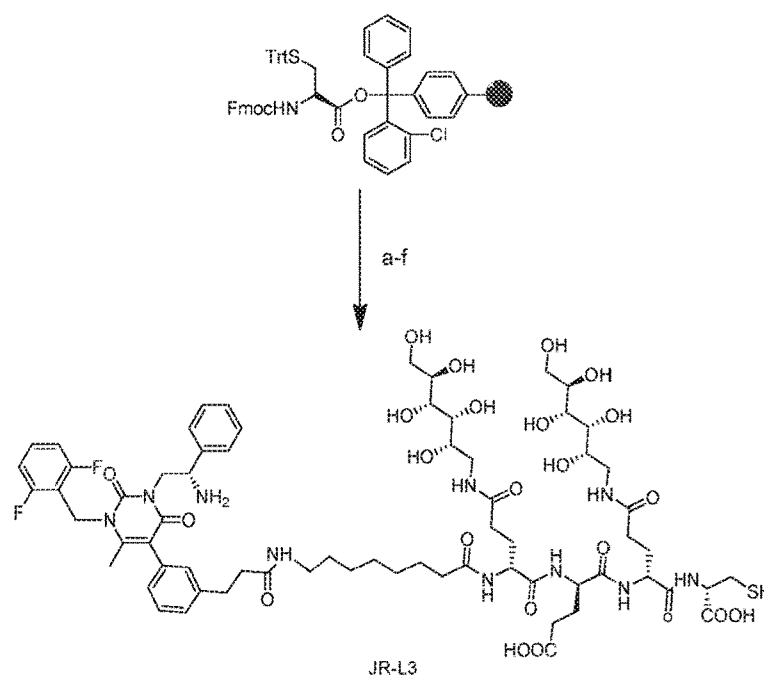
JL-L3-Rodamina



Esquema 7. Síntesis de JR-L2-Rodamina, Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) ácido Fmoc-N-amido-dPEG₆, PyBop, DMF, DIPEA, (b) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, 10 min (ii) JL, PyBop, DMF, DIPEA, (c) TFA/H₂O/TIPS/EDT (92,5:2,5:2,5:2,5), 1 hora, (d) JL-L2, Rodamina maleimida, DMSO anhidro, DIPEA, ta

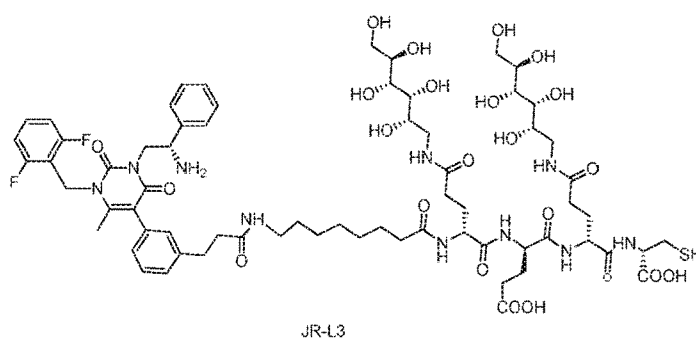
Síntesis de JL-L2: El antagonista de LHRH-R (JL) se sintetizó según el procedimiento publicado anteriormente²⁷ excepto en la última etapa en lugar del derivado éter del reactivo, se utilizó un derivado de ácido carboxílico. Esta modificación se realizó para facilitar el acoplamiento con el enlazador. El enlazador se preparó mediante la síntesis peptídica en fase sólida estándar como se describe en la Figura 1 de SI. Después se acopló JL al enlazador en la fase sólida. Después de completar el acoplamiento, el producto se escindió de la resina usando la solución cóctel de TFA: Agua:TIPS: Etanoditil (95 %: 2,5 %: 2,5 %: 2,5 %). El JL-L2 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir un 70 % del producto deseado. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calc. para C₄₇H₆₁F₂N₅O₁₂S, 958,08; encontrado 959.

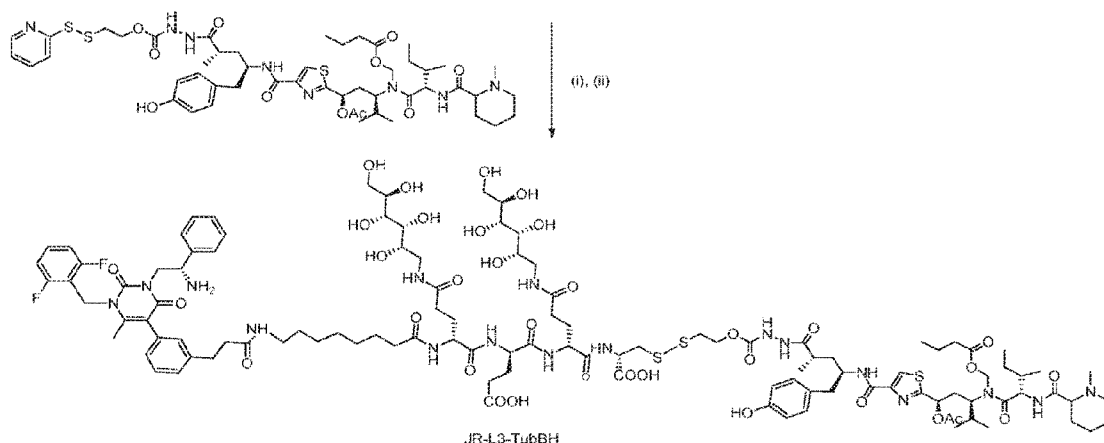
Síntesis de JL-L2-Rodamina: Para sintetizar el conjugado del colorante rodamina, se disolvieron JL-L2 purificado y rodamina maleimida (1 eq) en DMSO anhidro y DIPEA (2 eq.). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. (SI Figura 1) El progreso de la reacción se controló utilizando LRMS-LCMS analítico. Después de 1 hora se encontró que la reacción se había completado. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativo [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 7,0), B = acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 50 % de B en 35 min] para producir un 90 % del producto deseado. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calc. para, C₇₅H₈₄F₂N₈O₁₇S, 1439,59; encontrado 1440. El trazo de LRMS-CL/EM de JR-L2 rodamina se muestra en la Figura 5.



Esquema 8. Síntesis de JR-L3, Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) 3,4,5,6-di-isopropiliden-1-amino-desoxi(Fmoc-Glu-OH)-D-lucitol, PyBop, DMF, DIPEA, (b) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) Fmoc-Glu(OtBu)-OH, PyBop, DMF, DIPEA, (c) (i) piperidina/DMF al 20 %, ta, (ii) 3,4,5,6-di-isopropiliden-1-amino-desoxi(Fmoc-Glu-OH)-D-glucitol, PyBop, DMF, DIPEA, d) (i) piperidina al 20 %/DMF, ta, (ii) ácido Fmoc-8-amino-octanoico, PyBop, DMF, DIPEA, 4 horas (e) (i) piperidina al 20 %/DMF, ta, 10 min (ii) JL, PyBop, DMF, DIPEA, (f) TFA/H₂O/TIPS/EDT (92,5:2,5:2,5:2,5), 1 hora.

Síntesis de JL-L3: JL-L3 se preparó mediante la síntesis peptídica en fase sólida estándar como se describe en la Figura 2 SI. El producto final se separó de la resina usando la solución cóctel de TFA:Agua:TIPS: Etanoditiol (95 %: 2,5 %: 2,5 %: 2,5 %). El JL-L3 bruto se purificó usando RP-HPLC [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH: 5,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir un 80 % del producto deseado. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calc. para C₆₇H₉₄F₂N₁₀O₂₃S, 1477,59; encontrado 1478. El trazo de LRMS-CL/EM de JR-L3 se muestra en la figura 6.

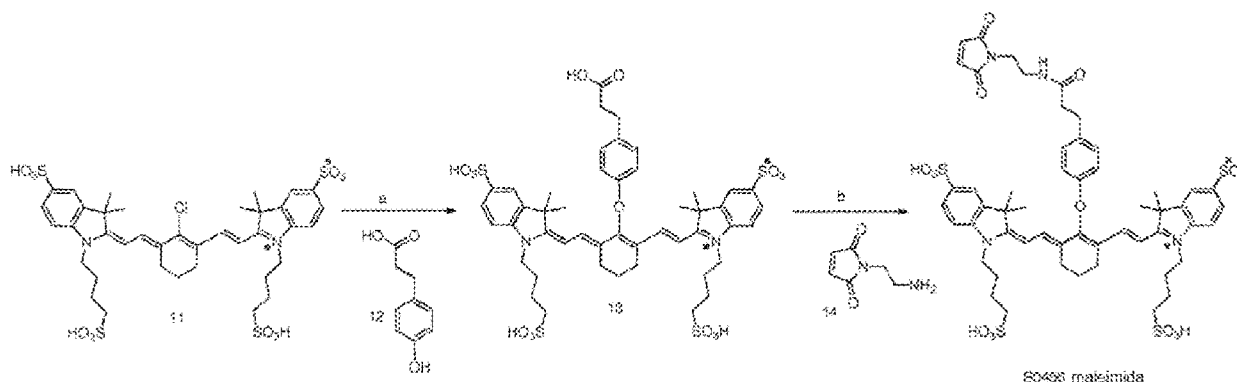




Esquema 9. Síntesis de JR-L3-TubBH, Reactivos y condiciones: (i) JL-L3, H₂O/NaHCO₃, (pH= 7,0-7,2), Argón, t.a. (ii) TubBH activada, THF anhidro, argón, t.a.

Síntesis de JL-L3-TubBH: El conjugado de tubulicina B-hidrazida se sintetizó como se describe a continuación. Se purgó una solución saturada de bicarbonato de sodio en agua calidad HPLC con argón durante 15 minutos. JL-L3 se disolvió en agua purgada con argón de calidad HPLC y luego se ajustó el pH a 7,0 usando una solución saturada de bicarbonato de sodio. A esta mezcla de reacción, se añadió tubulicina B hidrazida activada con disulfuro (1 eq) en THF. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. El progreso de la reacción se controló mediante LRMS-LCMS analítico. Después de 30 minutos se encontró que la reacción se había completado. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa [A = tampón acetato de amonio 2 mM (pH 7,0), B= acetonitrilo, gradiente de disolvente del 0 % de B al 80 % de B en 35 min] para producir un 90 % del producto deseado. LRMS-CL/EM (m/z): [M+H]⁺ calc. para C₁₁₂H₁₆₁F₂N₁₇O₃₄S₃, 2423,78; encontrado 2424.

Cultivo celular: Las células de cáncer de mama positiva para LHRH-R, MDA-MB231 y las líneas de células SKVO3 de células de cáncer de ovario negativas para LHRH-R se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1 % de penicilina-estreptomicina a 37 °C en un 95 % de aire humidificado y 5 % de atmósfera de CO₂. El trazo de LRMS-CL/EM de JR-L3-TubBH se muestra en la Figura 7.



Esquema 10. Síntesis de S0456 maleimida. Reactivos y condiciones: a) KOH, H₂O, ta-100 °C; b) HATU, Anh. DIPEA, Anh. DMF, ta. El trazo de CL/EM de S0456 maleimida se muestra en la Figura 8.

Ejemplos de métodos

Ejemplo de método 1. JL-L1-S0456, JL-L2-S0456, JL-L3-S0456

Cultivo celular: Células de cáncer de mama MDA-MB231, células de cáncer de endometrio HEC-1B y células de cáncer de ovario OVCAR-3 se cultivaron como una monocapa en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 1 % de glutamina 2 mM y 1 % de penicilina-estreptomicina a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Las células MDA-MB231 se cultivaron en stock congelado, mientras que las células HEC-1B y OVCAR-3 se adquirieron de ATCC.

Microscopia de fluorescencia: Las tres células se sembraron y se dejaron crecer hasta formar una monocapa en un cubreobjetos con cámara durante 48 horas. El medio gastado se reemplazó con una concentración 100 mM del

conjugado en presencia o ausencia de un exceso de JL-L3 y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con medio nuevo para eliminar el conjugado de fluorescencia no unido. Se añadió medio fresco (0,5 ml) a las células y las imágenes se adquirieron mediante un microscopio de fluorescencia (Nikon 90i).

Ensayo de unión: Se sembraron 100.000 células MCF7 en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer hasta formar una monocapa durante 48 horas. El medio gastado se reemplazó con medio nuevo que contenía diversas concentraciones del conjugado de colorante en presencia o ausencia de un exceso del ligando no marcado. Tras incubación durante 1 hora a 37 °C, las células se lavaron tres veces con medio nuevo y se disolvieron en SDS al 0,5 %. La fluorescencia se midió usando un fluorímetro. Todos los conjugados finales se purificaron mediante HPLC antes de su uso en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Afinidad de unión in vitro: La afinidad de unión del conjugado de fluorescencia (JL-L3-S0456) se determinó en las células de cáncer de mama MDA-MB231. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 9. Las células se expusieron a diversas concentraciones del conjugado de colorante NIR (JL-L3-S0456) y se determinó la Kd aparente midiendo la fluorescencia unida a las células. Las células se incubaron con diversas concentraciones del conjugado de colorante, ya sea en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces del conjugado sin marcar a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces y luego se disolvieron en SDS al 1 %. La fluorescencia unida a las células se midió mediante un fluorímetro. Se encontró que el 1 % aparente del conjugado era 3,5 nM, mientras que se informó que la Ki del ligando original era 0,19 nM. Esto indica que la introducción del enlazador entre el ligando y el colorante NIR redujo la afinidad de unión del ligando de direccionamiento en el intervalo nanomolar bajo. La adición de un exceso de 100 veces del ligando de direccionamiento no marcado (JL-L3) disminuyó significativamente la intensidad de fluorescencia unida a células de MDA-MB231 con JL-L3-S0456. Esto confirmó que la unión de JL-L3-S0456 a las células MDA-MB231 está mediada por receptores. Por tanto, *in vitro*, JL-L3-S0456 mostró baja afinidad de unión nanomolar y especificidad por el receptor.

Cría de animales: Los ratones nu/nu hembra, de 5-6 semanas de edad se adquirieron en Harlan Laboratories. Los animales se alojaron en ciclos convencionales de luz y oscuridad de 12 horas y tuvieron acceso a pienso para roedores normal y agua a discreción. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Purdue Animal Care and Use Committee.

Formación de imágenes de fluorescencia in vivo y biodistribución. Para el desarrollo de xenoinjertos tumorales subcutáneos, MDA-MB231, OVCAR-3 y HEC-1B 5 x 10⁶ células se inyectaron por vía subcutánea en 0,2 ml de PBS estéril en el flanco trasero derecho de los ratones hembra nu/nu. La formación de imágenes del tumor se inició una vez que el volumen del tumor alcanzó entre 200 mm³ y 300 mm³. A cada ratón portador de tumor se le inyectó por vía intravenosa (a través de la vena de la cola) 10 nanomoles de conjugado de colorante fluorescente, ya sea en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces del conjugado sin marcar. Los animales fueron sacrificados dos horas después de la inyección usando CO₂ y las imágenes se adquirieron usando un calibre IVIS Luminal II. Después de realizar la imagen de cuerpo entero, se extrajeron los órganos de interés y se tomaron imágenes para inspeccionar la acumulación de fluorescencia en estos órganos. Los parámetros de adquisición de imágenes fueron los siguientes: i) nivel de lámpara alto, ii) excitación-745 nm, iii) emisión-ICG, iv) agrupamiento (M) 4M, (v) f-parada-4, (vi) FOV-12,5, (vii) tiempo de adquisición, 1 s. Todos los conjugados finales se purificaron mediante HPLC antes de su uso en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Para determinar la eficacia de los conjugados para atacar el tumor positivo para el receptor, se inyectó *in vivo* a ratones atímicos hembra nu/nu se les implantó por vía subcutánea MCF7, MDA-MB231, OVCAR3 o HEC-1B. Una vez que el tumor alcanzó un volumen apropiado, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa los conjugados de colorante (10 nmoles) en presencia o ausencia del exceso de la molécula diana no marcada. Se tomaron imágenes de los ratones 2 horas después de la inyección para investigar la acumulación de los conjugados de colorante en el tumor y otros órganos vitales.

La figura 10A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L1-SQ456 en xenoinjertos de tumores MCF-7. Los ratones se trataron por vía intravenosa con el conjugado colorante en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de los conjugados no marcados. La figura 10B muestra la absorción de JL-L1 - S0456 por varios órganos. Todas las imágenes se adquirieron 2 horas después de la inyección. Lista de órganos de arriba a abajo: Cerebro, tumor, bazo, riñón, intestino delgado, intestino grueso, músculo, piel, corazón, pulmones, hígado y estómago.

El conjugado de colorante JL-L1-S0456 no mostró ninguna absorción en el tumor ni en ningún otro órgano cuando se excitó a 745 nm, pero tras la excitación, a 640 nm se encontró que la fluorescencia se acumulaba principalmente en el tumor, riñón y cerebro, que se encontró que no competían. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se plantearon dos razones para este comportamiento inesperado de JL-L1-S0456. En condiciones adecuadas, la amina primaria puede desplazar el oxígeno hidroxilo del grupo fenólico del colorante para formar un enlace CN entre el colorante y el resto de la molécula. Este reemplazo puede dar como resultado un cambio en la excitación del colorante de 745 nm a 640 nm.

La figura 11A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L2-S0456 en xenoinjertos de tumores MDA-

MB231. Los ratones se trataron por vía intravenosa con el conjugado colorante en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de los conjugados no marcados. La Figura 11B muestra la absorción de JL-L2-S0456 por varios órganos. Todas las imágenes se adquirieron 2 horas después de la inyección. Lista de órganos de arriba a abajo: Tumor, corazón, pulmones, páncreas, bazo, músculo, piel, intestino delgado, intestino grueso, estómago, hígado y riñón.

Cuando se prueba *in vivo* JL-L2-S0456 mostró absorción mediada por receptores en los tumores de cáncer de mama. También se observó absorción inespecífica en riñón y hígado. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, dado que el hígado y el riñón desempeñan un papel vital en la excreción, la fluorescencia en estos órganos se debió a la eliminación del conjugado del colorante por vía renal y hepática.

La figura 12A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores MDA-MB231. Los ratones se trataron por vía intravenosa con el conjugado colorante en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de los conjugados no marcados. La Figura 12B muestra la absorción de JL-L3-SG456 por varios órganos. Todas las imágenes se adquirieron 2 horas después de la inyección. Lista de órganos de arriba a abajo: Tumor, cerebro, corazón, pulmones, estómago, intestino delgado, intestino grueso, músculo, páncreas, bazo, hígado y riñón.

La figura 13A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores HEC-1B. Los ratones se trataron por vía intravenosa con el conjugado colorante en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de los conjugados no marcados. La Figura 13B muestra la absorción de JL-L3-S0456 por varios órganos. Todas las imágenes se adquirieron 2 horas después de la inyección. Lista de órganos de arriba a abajo: Tumor, corazón, pulmones, bazo, páncreas, músculo, estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado y riñón.

La figura 14A muestra la absorción *in vivo* del conjugado de colorante JL-L3-S0456 en xenoinjertos de tumores OVCAR3. Los ratones se trataron por vía intravenosa con el conjugado colorante en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de los conjugados no marcados. La Figura 14B muestra la absorción de JL-L3-S0456 por varios órganos. Todas las imágenes se adquirieron 2 horas después de la inyección. Lista de órganos de arriba a abajo: Tumor, corazón, pulmones, bazo, páncreas, músculo, estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado y riñón.

El enlazador PEG fue reemplazado además por un enlazador que contenía peptidoglicanos, JL-L3-S0456. Después de 2 horas tras la inyección, se descubrió que JL-L3-SQ456 estaba acumulado en el tumor de cáncer de mama. El conjugado de direccionamiento no marcado (JL-L3) pudo competir con la absorción tumoral de JL-L3-S0456. El estudio de biodistribución mostró que, además del tumor, el riñón también mostró una alta fluorescencia. La intensidad de fluorescencia del tumor era menor que la del riñón, pero la acumulación del conjugado de colorante en el tumor estaba mediada por receptores, mientras que la del riñón se debía a la excreción del conjugado de colorante por vía renal. En el hígado se observó fluorescencia mínima o nula.

Estudio del curso del tiempo. La eficacia de JL-L3-S0456 para acumularse en los tumores con receptores positivos se inspeccionó más a fondo mediante la inyección del conjugado de colorante en cáncer de ovario y xenoinjertos de endometrio. En ambos modelos, JL-L3-S0456 mostró absorción mediada por receptores y se excretó por vía renal. Aparte del tumor y el riñón, otros órganos mostraron poca o ninguna señal. Para investigar el tiempo de retención del conjugado de colorante en el tumor se realizó un estudio de evolución temporal. A los ratones se les inyectaron 10 nmoles de los conjugados de colorante y se tomaron imágenes a las 2 horas, 8 horas y 12 horas. Incluso después de 12 horas después de la inyección, se encontró que la intensidad de fluorescencia del tumor era alta y solo se observó una disminución muy leve en la intensidad en comparación con la imagen tomada 2 horas después de la inyección.

Los resultados de las imágenes en el transcurso del tiempo del tumor MDA-MB231 con JL-L3-S0456 se muestran en la Figura 15A. Las imágenes fueron tomadas a las 2 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas después de la inyección para estudiar la retención tumoral del conjugado del colorante. La Figura 15B muestra que se observó la absorción de JL-L3-S0456 por varios órganos en varios momentos. Lista de órganos de arriba a abajo: Tumor, cerebro, corazón, pulmones, estómago, intestino delgado, intestino grueso, bazo, páncreas, músculo, piel e hígado.

El conjugado de colorante mostró una absorción mediada por receptores en el tumor, mientras que la absorción en el riñón no estaba mediada por receptores y se debía a la excreción del conjugado por vía renal. Además, el colorante NIR también tiene una mayor penetración en el tejido, lo que puede ayudar aún más a la resección eficaz de la masa tumoral. En general, los resultados *in vivo* en los modelos de ratón respaldan que JR-L3-S0456 para cirugía guiada por fluorescencia en seres humanos para diseccionar las células cancerosas que expresan LHRH-R.

Se evaluó además la eficacia del conjugado radioactivo para atacar tumores *in vivo* en xenoinjertos de cáncer de mama humano triple negativo.

Ejemplo de método 2. JL-L1 A, JL-L2A, JL-L3A

Cultivo celular. Se cultivaron células MDA-MB231 de cáncer de mama como una monocapa en un medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10 %, 1 % de penicilina-estreptomycin y 2 mm de glutamina al 1 %. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y atmósfera humidificada con aire al 95 %.

Cría de los animales e implantación del tumor in vivo. Se adquirieron ratones hembra atímicos nu/nu de los laboratorios Harlan. Los animales se alojaron en un ambiente estéril y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/día. Los animales tienen libre acceso a comida para roedores y agua. Se suspendieron 2×10^6 células MDA-MB231 en 100 microlitros de solución salina tampón fosfato estéril y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de cada ratón.

Ensayo de unión in vitro. Se sembraron células MDA-MB231 en una placa de 24 pocillos y se les permitió formar una monocapa. El medio gastado se reemplazó con medio libre de suero que contenía diversas concentraciones del conjugado radiactivo (JL-L1A o JL-L2A o JL-L3A) ya sea en presencia o ausencia de un exceso de conjugados no marcados. Las células se incubaron durante 2 horas a 37°C y luego se enjuagaron tres veces con medio. Después del enjuague, las células se disolvieron añadiendo 0,5 ml de NaOH 0,25 N a cada pocillo durante 20 minutos. La radiactividad unida a las células se midió utilizando el contador gamma Packcard y el K_d se calculó utilizando el prisma del panel gráfico trazando la radiactividad unida a las células frente a la concentración de radiotrazador. Como se muestra en la Figura 16, Se incubaron células MDA-MB231 con diversas concentraciones del conjugado radiactivo en presencia o ausencia del exceso del conjugado no marcado. El círculo sólido indica conjugados quelados con ^{99m}Tc , mientras que el círculo abierto indica competencia.

Imágenes in vivo y biodistribución. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas aprobadas por el Purdue Animal Care and Use Committee. El experimento se inició una vez que el volumen del tumor alcanzó aproximadamente $300\text{--}400\text{ mm}^3$. El volumen del tumor se midió como $0,5 \times L \times W^2$, donde L es el eje más largo y W es un eje perpendicular a L en mm. En la vena lateral de la cola, a los ratones se les inyectaron $150\text{ }\mu\text{Ci}$ de los conjugados radiactivos (ya sea en presencia o ausencia de un exceso de los conjugados no marcados) en $100\text{ }\mu\text{l}$ de solución salina tampón fosfato estéril. Para obtener imágenes, los ratones fueron sacrificados 2 horas después de la inyección con asfixia con CO_2 y se tomaron imágenes con Kodak Imaging Station. Después de realizar una necropsia por imágenes, se realizó una necropsia en los animales para extraer el tejido seleccionado y ponderarlo. La radiactividad unida al tejido se cuantificó utilizando un contador gamma (Contador Gamma Packard). Para el estudio del curso del tiempo, se sacrificó a los animales en los siguientes momentos después de las inyecciones: 2 horas, 4 horas, 6 horas y 8 horas. Se pesó el tejido de interés y se contó la radiactividad unida al tejido utilizando un contador gamma. Los valores del recuento por minuto de la radiactividad unida a los tejidos se corrigieron y se convirtieron en porcentaje de dosis inyectada por gramo del tejido (% DI/g). Los datos se analizaron utilizando Graphpad Prism.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los tres enlazadores contribuyeron a i) la hidrofilia y solubilidad de los compuestos finales ii) a disminuir la difusión pasiva no específica de los conjugados en las células que carecen del receptor de direccionamiento. iii) impedir la interferencia del grupo quelante ^{99m}Tc con la unión del ligando objetivo. Los tres conjugados mostraron más del 95 % de eficiencia de quelación.

Para determinar la afinidad de unión, las células MDA-MB231 se incubaron con diversas concentraciones del conjugado radiactivo JL-L1A, ya sea en presencia o ausencia del conjugado sin marcar, durante 2 horas a 37°C . El conjugado JL-L3A mostró una baja afinidad de unión nanomolar por L HRH-R ($K_d = 14,39\text{ nM}$). Esto indicó que, como resultado de la conjugación con un espaciador, la afinidad de unión del compuesto original ($K_i = 0,4\text{ nM}$) no se vio intensamente afectada y aún se mantuvo en el intervalo nanomolar bajo. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, en presencia de un exceso de ligando competidor, la radiactividad unida a las células disminuyó, lo que sugiere que la unión de JL-L3A a la célula MDA-MB231 está mediada por receptores.

Imágenes in vivo de cuerpo entero y biodistribución de JL-L1A, JL-L2A y JL-L3A. Para investigar la absorción de conjugados radiactivos en tumores positivos para LHRH-R, se inyectaron los tres conjugados ($150\text{ }\mu\text{Ci}$) en la vena lateral de ratones con tumores MDA-MB231. Para estudios de competición, a los ratones se les inyectó adicionalmente un exceso de 100 veces de los conjugados no marcados. A ratones portadores de tumores MDA-MB231 se les inyectaron los conjugados quelados ^{99m}Tc en la vena lateral de la cola (ratones etiquetados como tratados). A otro grupo de ratones se les inyectaron las moléculas marcadas con ^{99m}Tc pero en presencia de un exceso de conjugados no marcados. Las imágenes se tomaron 2 horas después de las inyecciones. La figura 17A representa imágenes de cuerpo entero de JL-L1A, mientras que la figura 17B y la figura 17C representan imágenes de cuerpo entero de JL-L2A y JL-L3A respectivamente. ($n=5$). Los tres conjugados radiactivos mostraron absorción mediada por receptores en el tumor. JL-L1A mostró la mayor absorción en el tumor pero también mostró absorción en otros órganos vitales. Por el contrario, JL-L2A y JL-L3A mostraron la mayor absorción en el riñón, pero esto no fue comparable con la coadministración del conjugado sin marcar. La absorción inespecífica de los conjugados en el riñón y el hígado sugirió la eliminación de las moléculas por vía renal y hepática. Además del riñón, el hígado y el tumor, JL-L2A también mostró una absorción inespecífica significativa en el bazo, pero sólo se observó una actividad mínima con la administración de JL-L3A.

A continuación se investiga la retención de JL-L3A quelado con ^{99m}Tc , el conjugado radiactivo se inyectó en ratones con xenoinjertos de MDA-MB231. Después sacrificar a los animales a las 2 horas, 4 horas y 8 horas de la inyección se tomaron imágenes y se contó la radioactividad asociada con los órganos de interés. Las imágenes dependientes del tiempo mostraron que la intensidad de la radioactividad del tumor 8 horas después de la inyección se redujo a menos de la mitad de la intensidad 2 horas después de la inyección. La biodistribución dependiente del tiempo a las

4 horas fue similar a la biodistribución 2 horas después de la inyección, como se muestra en la Figura 18. A ratones portadores de tumores MDA-MB231 se les inyectaron los conjugados quelados ^{99m}Tc en la vena lateral de la cola (ratones etiquetados como tratados). A otro grupo de ratones se les inyectaron las moléculas marcadas con ^{99m}Tc pero en presencia de un exceso de conjugados no marcados. La radiactividad de todos los órganos principales y la sangre se determinó 2 horas después de la inyección y se representó el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido. La Figura 18A representa la biodistribución de JL-L1A mientras que la Figura 18B y la Figura 18C representan la biodistribución de JL-L2A y JL-L3 A respectivamente (n=5). La barra de error indica la desviación estándar.

Las Figuras 19A, B y C muestran *in vivo* imágenes de cuerpo entero y biodistribución de JL-L1A a las 2 horas, 4 horas y 8 horas postinyección, respectivamente. A los ratones que portaban un tumor MDA-MB231 se les inyectaron 150 μCi de JL-L1A quelado con ^{99m}Tc mediante inyección en la vena de la cola. Los ratones fueron sacrificados 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la inyección y se tomaron imágenes. Para la biodistribución, se diseccionaron los órganos de interés y se contó la radiactividad utilizando un contador de centelleo gamma. Como se muestra en la Figura 19D, el porcentaje de dosis inyectada/g de tejido se representó frente a los órganos respectivos. La barra de error indica la desviación estándar.

En todos los órganos se observó una disminución de la radiactividad en función del tiempo. Los tres conjugados exhibieron acumulación mediada por receptores en el tumor, pero JL-L3 A mostró las biodistribuciones más favorables 2 horas después de la inyección. La distribución tisular de JL-L3 A a las 4 horas y 8 horas después de la inyección mostró el mismo patrón que 2 horas después de la inyección. La absorción renal y hepática del conjugado fue inespecífica y fue el resultado del aclaramiento renal y hepático de la molécula, JL-L3A posee una estabilidad química superior, facilidad de síntesis y propiedades de radiomarcado específicas del sitio en comparación con los péptidos dirigidos a LHRH-R.

Ejemplo de método 3. JL-L2-rodamina, JR-L3, JR-L3-TubBH

Microscopia confocal: Se sembraron 50.000 células cancerosas humanas MDA-MB231 y SKVO3 en cada pocillo de placas de vidrio con cámara y se dejaron crecer hasta confluencia durante 48 horas. El medio gastado se reemplazó con 0,5 ml de medio fresco FBS y se incubó con 100 nM de conjugado de colorante de rodamina (JL- L2-Rodamina) ya sea en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de JL-L2. Después de la incubación durante 1 hora, las células se lavaron con solución de incubación tres veces y luego se reemplazaron con 0,5 ml de medio de cultivo. Las imágenes se adquirieron utilizando microscopia confocal Olympus.

Determinación in vitro de la viabilidad celular. Se sembraron células MDA-MB231 y SKVO3 a una concentración de 100.00 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se dejaron crecer en monocapas. Se retira el medio gastado y las células se incuban con diversas concentraciones de JL-L3-TubBH en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de JL-L3 en medio libre de FBS. Después de incubar durante 2 horas a 37 °C, las células se enjuagaron tres veces con medio fresco y luego se incubaron en 0,5 ml de medio fresco durante 66 horas adicionales a 37 °C. Luego, el medio enviado se reemplazó con 0,5 ml de medio que contenía ^3H -timidina y se incubaron durante 4 horas adicionales. Luego, las células se lavaron nuevamente tres veces con medio nuevo y luego se incubaron con 0,5 ml de ácido tricloroacético al 2,5 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar el ácido tricloroacético, las células se disolvieron en NaOH 0,25 N. La viabilidad celular se determinó contando la incorporación de ^3H -timidina en células usando contador de centelleo (Packard, Packard Instrument Company). El valor de CI_{50} se derivó de una gráfica del porcentaje de incorporación de timidina H^3 frente a la concentración logarítmica usando Graph Pad Prism 4.

Cría de animales: Se adquirieron ratones atímicos nu/nu de los laboratorios Harlan. Los ratones se alojaron en un ambiente estéril en un ciclo estándar de luz y oscuridad de 12 horas y se mantuvieron con comida normal para roedores. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Purdue Animal Care and Use Committee de acuerdo con las pautas de los Institutos Nacionales de Salud.

Modelo tumoral y terapia: A ratones desnudos atímicos hembra nu/nu de 5-6 semanas de edad se les inyectó por vía subcutánea $5,0 \times 10^6$ células de cáncer de mama MDA-MB231 y células de cáncer de ovario SKVO3 en sus hombros. Los tumores se midieron en dos direcciones perpendiculares 3 veces por semana con calibres Vernier y sus volúmenes se calcularon como $0,5 \times L \times W^2$, donde L es el eje más largo (en milímetros) y W es el eje perpendicular a L (en milímetros). El tratamiento se inició una vez que el volumen del tumor alcanzó $\sim 100 \text{ mm}^3$. Las soluciones de dosificación se prepararon en solución salina estéril y se inyectaron por vía intravenosa. Cada ratón recibió 2 $\mu\text{mol/kg}$ de JL-L3-TubBH en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de JL-L3 o solución salina. A los ratones se les administraron los agentes de prueba 3 veces por semana durante 3 semanas y, como medida de la toxicidad bruta, se pesaron simultáneamente los ratones en cada dosis.

Unión e internalización del conjugado de colorante de rodamina: El conjugado de rodamina dirigido a LHRH-R se probó en células MDA-MB231 y SKOV3 para evaluar la unión y la internalización del conjugado de tinte. Para esto, las células cancerosas se incubaron durante 1 hora con diversas concentraciones del conjugado de colorante de rodamina (JL-L2-rodamina), ya sea en presencia o ausencia de exceso de JL-L2. Después de lavar el exceso de conjugado de colorante, las células fueron examinadas mediante microscopia confocal.

Las células se incubaron con 100 nM de JL-L3-rodamina en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de JL-L3. Después de 1 hora, las células se lavaron tres veces y se tomaron imágenes de luz blanca y fluorescencia utilizando el microscopio confocal. Se observó que el conjugado de rodamina estaba presente tanto en el interior como en la superficie de las células en las células MDA-MB231, mientras que no se observó absorción en las células SKOV3, como se muestra en la figura 20.

Citotoxicidad in vitro del conjugado de tubulicina B-hidrazida: Para inspeccionar la eficacia letal del conjugado terapéutico, se incubaron células cancerosas MDA-MB231 y SKOV3 con diversas concentraciones de JL-L3-TubBH en presencia o ausencia de exceso de JL-L3, durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar el exceso de conjugado, las células se incubaron en medios nuevos durante 66 horas adicionales seguido de una incubación con medios que contenían ³H-timidina para evaluar la viabilidad celular. La radiactividad se contó utilizando el contador de centelleo de PerkinElmer. Se repitió el mismo procedimiento después de exponer las células a la tubulicina B hidrazida libre. Se descubrió que ambas líneas celulares cancerosas MDA-MB231 y SKOV3 eran sensibles a la tubulicina B hidrazida libre, lo que demuestra un valor de CI_{50} de 67 pM y 5 pM respectivamente como se muestra en la Figura 21. En las células MDA-MB231 positivas al receptor, el conjugado dirigido (JL-L3-TubBH) exhibió un valor de CI_{50} de 26 nM, mientras que en presencia de un exceso de ligando de competencia la potencia cayó intensamente a 382 nM. La capacidad de destrucción celular mediada por receptor del conjugado objetivo se confirmó aún más cuando se encontró que los valores de CI_{50} obtenidos de la línea celular negativa al receptor eran similares a los de la competencia MDA-MB231 (608 nM).

Eficacia in vivo del conjugado de tubulicina B hidrazida: Para investigar la eficacia del conjugado de tubulicina JL nu/nu, los tumores desnudos atímicos portadores de LHRH-R positivos (MDA-MB-231, cáncer de mama) se dividieron aleatoriamente en tres grupos: control salino, objetivo y competencia y luego fueron tratados con agentes de prueba 3 días por semana durante 3 semanas. Se implantaron sc células cancerosas positivas para LHRH-R (MDA-MB-231) y negativas (SKOV3) en ratones atímicos nu/nu y el tratamiento se inició una vez que el volumen del tumor alcanzó ~100 mm³. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en varios grupos con 5 ratones en cada grupo. Los ratones del grupo de control recibieron solución salina, mientras que los ratones del grupo de competición y de tratamiento recibieron 2 µmol/kg de JL-L3-TubBH en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de JL-L3 respectivamente 3 veces por semana durante 3 semanas. Todos los agentes de prueba se administraron por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los ratones del grupo de control y de competición fueron sacrificados después de la última acción, mientras que los ratones del grupo de tratamiento fueron monitorizados continuamente para detectar recurrencia del tumor y pérdida de peso. Los ratones con tumor MD-MB-231 que recibieron conjugado de hidrazida de tubulicina B dirigido (JL-L3-TubBH) mostraron una eliminación completa del tumor, mientras que los ratones que recibieron solución salina no mostraron ningún efecto antitumoral. Igualmente, los ratones del grupo de competición no mostraron ninguna disminución en el crecimiento del tumor en comparación con el grupo de control. (Figura 22A, La línea vertical de puntos indica el día de la dosificación final (día 36)) Sin pretender ceñirnos a ninguna teoría, esto confirmó además que la eficacia del conjugado de tubulicina B-hidrazida dirigido está mediada por receptores. Es más, para probar exhaustivamente la eficacia antitumoral del conjugado dirigido (JL-L3-TubBH), los ratones con tumores negativos para LHRH-R (SKOV3, cáncer de ovario) se dividieron en grupos similares a los ratones con tumores MDA-MB-231 y se siguió un régimen de tratamiento similar. No se observó ninguna reducción en el volumen del tumor en el grupo objetivo y de control de ratones con tumores con receptores negativos. (Figura 22C) Sin pretender quedar limitado por la teoría, estos datos reforzaron aún más que la citotoxicidad inducida por JL-L3-TubBH está mediada por receptores. Ninguno de los ratones que portaban MDA-MB-231 o SKVO3 experimentó una pérdida de peso significativa. (Figura 22B y 22D)

Después de completar el tratamiento, los ratones del grupo objetivo de MDA-MB-231 fueron monitorizados y mantenidos con una dieta regular durante las siguientes cinco semanas. Durante este período, se controló el volumen y el peso del tumor tres veces por semana. (Figura 23) Los ratones se trataron con el conjugado de hidrazida de tubulicina B dirigido a LHRH-R (JR-L3-TubBH) tres veces por semana durante 3 semanas (n=5). Después de completar el estudio, el volumen y el peso del tumor de los ratones se controlaron continuamente hasta 75 días después de la implantación del tumor. La línea vertical de puntos especifica el último día de dosificación. Ninguno de los ratones mostró ningún indicio de crecimiento tumoral ni pérdida de peso. Estos datos indican que el conjugado de hidrazida de tubulicina B dirigido a LHRH-R (JL-L3-TubBH) puede tratar los cánceres que expresan LHRH-R.

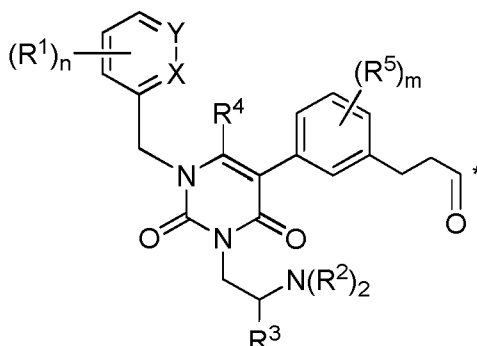
En resumen, el estudio actual demuestra la eficacia del fármaco citotóxico conjugado con el ligando de molécula pequeña no peptídica para LHRH-R. El conjugado dirigido pudo eliminar el tumor con receptor positivo y no se observó recurrencia del tumor durante al menos cinco semanas después de la última dosis del fármaco. No se observó eficacia tumoral en los ratones del grupo de competición o de control. El tumor negativo para el receptor no mostró ninguna reducción en el volumen del tumor cuando se trató con el conjugado de tubulicina dirigido a LHRH-R. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la eficacia del conjugado de tubulicina B dirigido está mediada por receptores. Durante el curso de la terapia, no se observó ninguna pérdida de peso observable, lo que sugiere que los efectos secundarios asociados con el fármaco libre se pueden reducir drásticamente conjugándolo con un ligando dirigido apropiado. De este modo, el resultado de este estudio proporciona datos que respaldan el uso de conjugados citotóxicos dirigidos a LHRH-R para el tratamiento de cánceres que expresan LHRH-R.

Debe entenderse que el uso de los artículos indefinidos "un" y "una" en referencia a un elemento no excluye la presencia, en algunas realizaciones, de una pluralidad de tales elementos.

- 5 La descripción detallada anterior y los dibujos adjuntos se han proporcionado a modo de explicación e ilustración, y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Muchas variaciones en las realizaciones actualmente preferidas ilustradas en el presente documento serán evidentes para un experto en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de la fórmula B-L-A, en donde B es un antagonista de la unión a LHRH-R de la fórmula



en donde

cada R^1 es independientemente halógeno, alquilo C_1-C_6 o alquilo $-OC_1-C_6$,

cada R^2 es independientemente H, alquilo C_1-C_6 o cicloalquilo C_3-C_6 ;

R^3 es alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo C_6-C_{10} o alquilo C_1-C_6 -(arilo C_6-C_{10});

R^4 es alquilo C_1-C_6 ;

cada R^5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, alquilo C_1-C_6 , alquilo $-OC_1-C_6$, alquilo $-SC_1-C_6$ y arilo $-OC_6-C_{10}$;

X e Y son cada uno independientemente N, CH o CR^1 ; siempre que cuando X es N, Y es CH o CR^1 , y cuando Y es N, X es CH o CR^1 ;

m es un número entero de 0 a 4; n es un número entero de 0 a 3; y

* representa un enlace covalente con L;

L es un enlazador seleccionado entre el grupo que consiste en

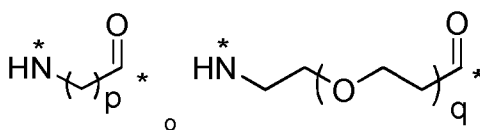
(a) al menos un aminoácido, seleccionado preferentemente entre el grupo que consiste en Lys, Asn, Thr, Ser, Ile, Met, Pro, His, Gln, Arg, Gly, Asp, Glu, Ala, Val, Phe, Leu, Tyr, Cys y Trp; o

(b) al menos dos aminoácidos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Glu y Cys; o

(c) una porción de aminoácido de la fórmula Glu-Glu, en donde los ácidos glutámicos están unidos covalentemente entre sí a través de las cadenas laterales de ácido carboxílico; o

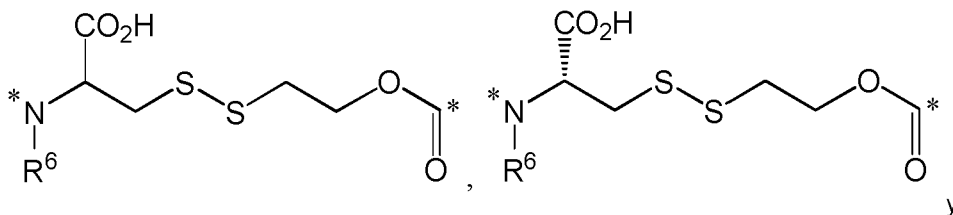
(d) uno o más enlazadores espaciadores hidrófilos que comprenden una pluralidad de grupos funcionales hidroxilo; o

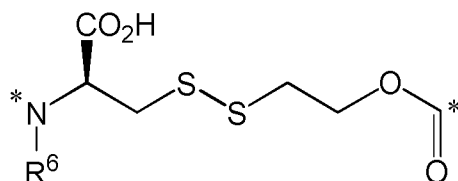
(e) una fracción de la fórmula



en donde p es un número entero de 3 a 10, q es un número entero de 3 a 100; y cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; o

(f) una porción seleccionada entre el grupo que consiste en

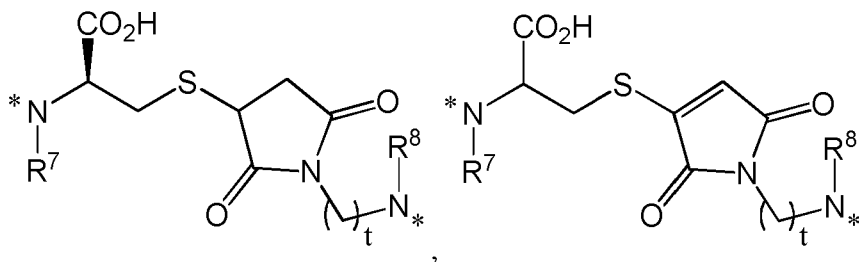
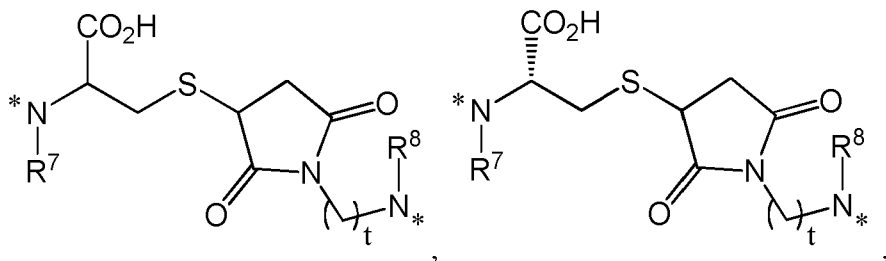




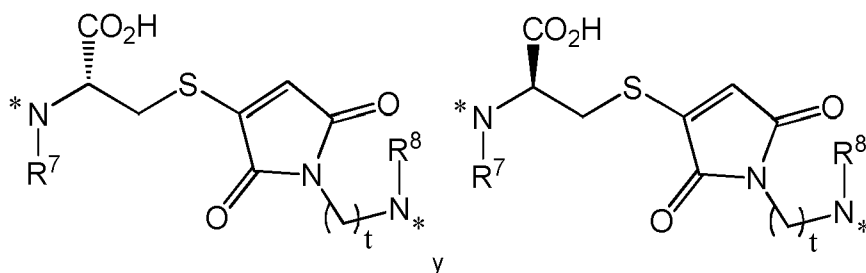
en donde R^6 es H o alquilo C_1-C_6 ; y
cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; o

5

(g) en donde el enlazador comprende una porción seleccionada entre el grupo que consiste en



10



y

en donde

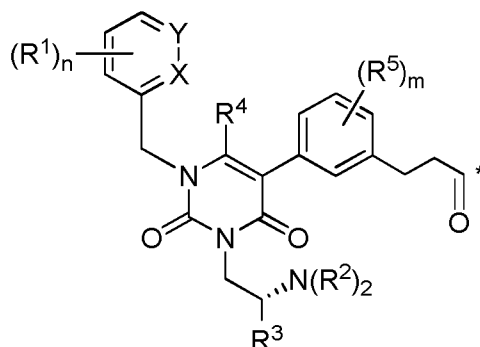
15 cada uno de R^7 y R^8 es independientemente H o alquilo C_1-C_6 ;
t es un número entero de 1 a 8; y

cada * representa un enlace covalente al resto del conjugado; y

(h) combinaciones de los mismos; y

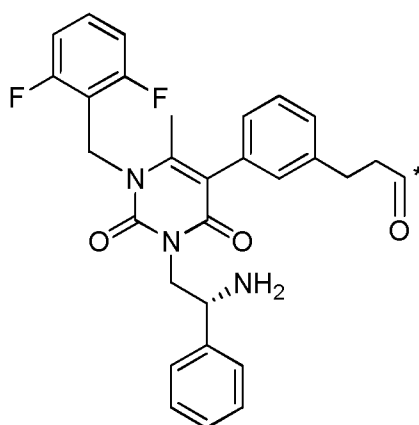
20 A es un fármaco terapéuticamente eficaz contra células cancerosas y/o fibroblastos asociados al cáncer (CAF) o
un agente de formación de imágenes; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. El conjugado de la reivindicación 1 de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

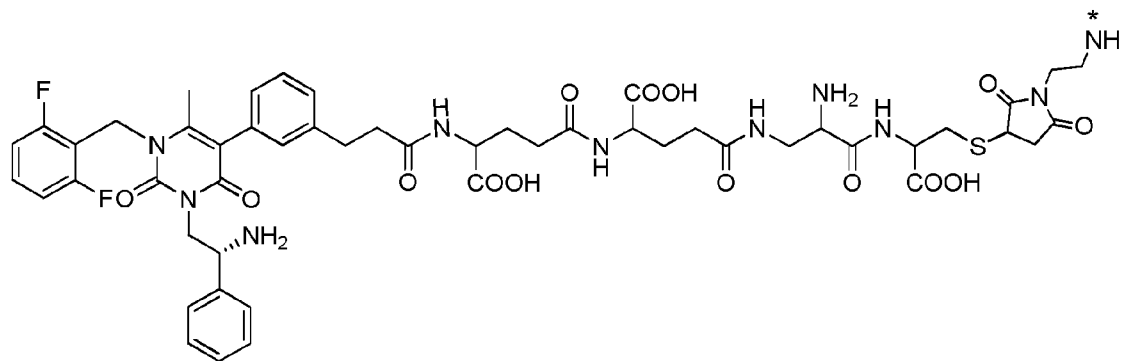
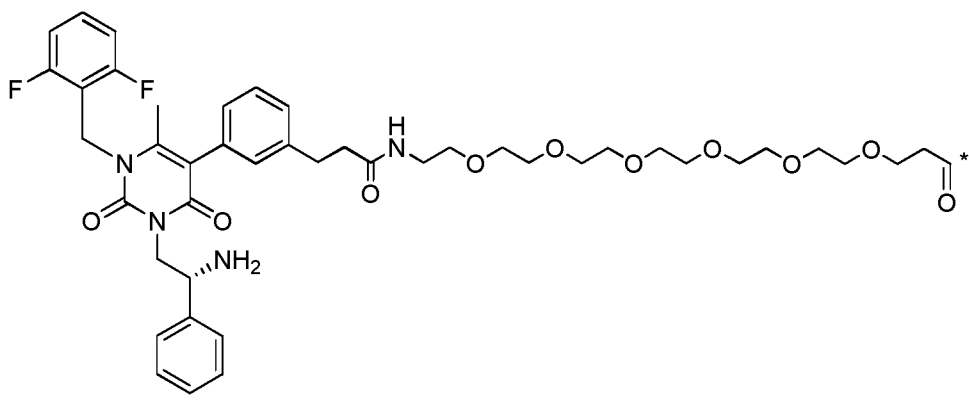
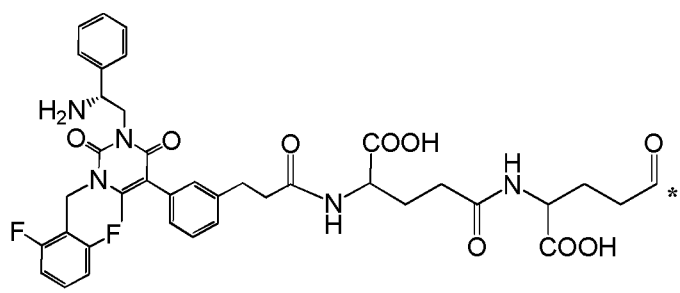
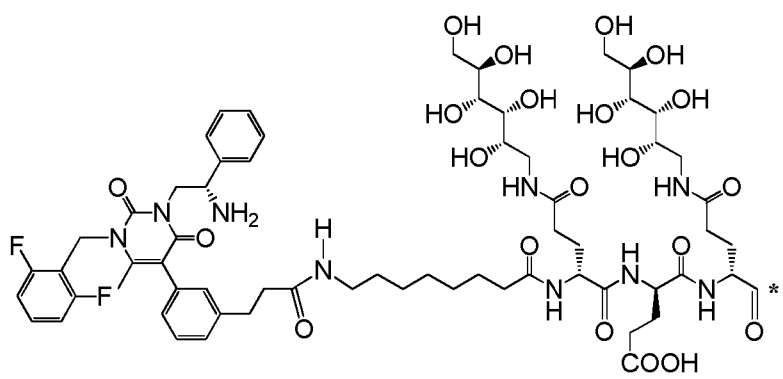
- 5 3. El conjugado de la reivindicación 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde n es 2.
4. El conjugado de la reivindicación 1, 2 o 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde m es 0.
- 10 5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- a) en donde cada R^1 , si está presente, es F; o
- b) en donde cada R^1 , si está presente, es F en las posiciones 2 y 6 del anillo al que cada R^1 se une; o
- c) en donde cada R^2 es H; o
- 15 d) en donde R^3 es alquilo C_1-C_6 -(arilo C_6-C_{10}); o
- e) en donde R^3 es $-CH_2-C_6H_5$; o
- f) en donde R^4 es metilo; o
- g) en donde cada R^5 , cuando está presente, es F, Cl, $-CH_3$, $-OCH_3$, $-OC_6H_5$ o $-SC_6H_5$.
- 20 6. El conjugado de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- a) en donde X es N e Y es CH; o
- b) en donde Y es N y X es CH; o
- c) en donde X es CR^1 e Y es CH o CR^1 , preferentemente en donde X es $-CF$ e Y es CH.
- 25 7. El conjugado de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde B es de la fórmula

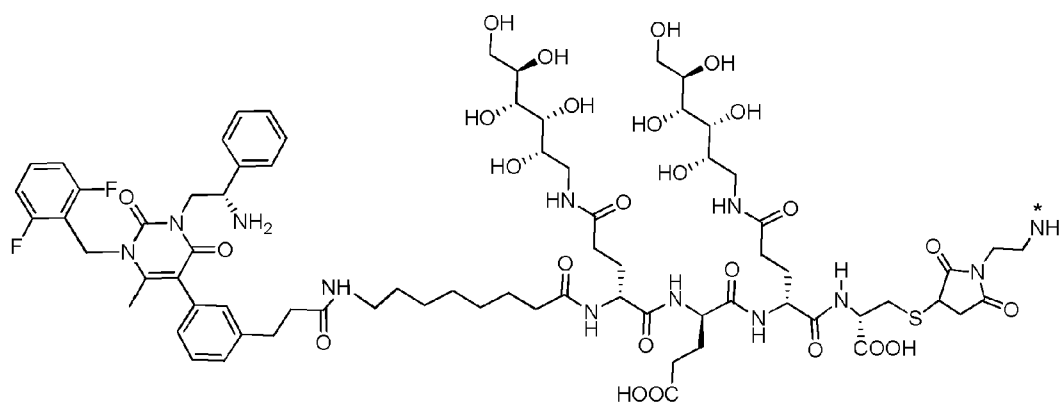
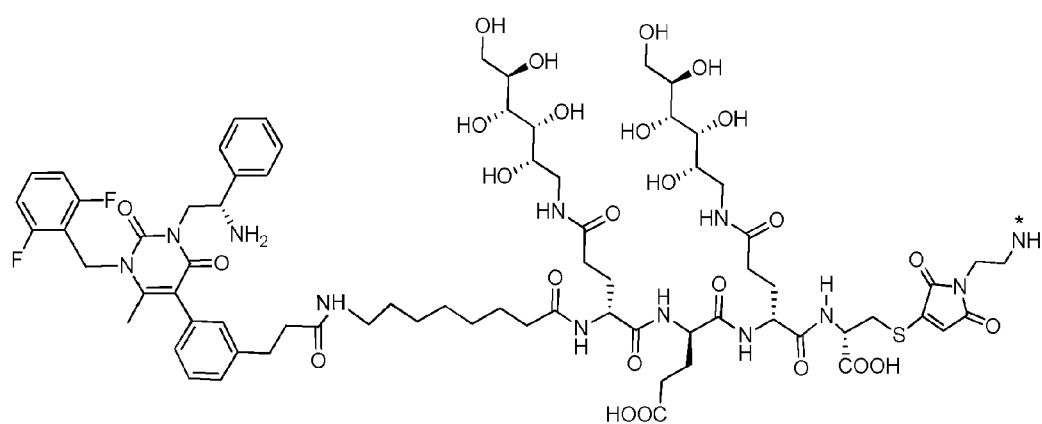
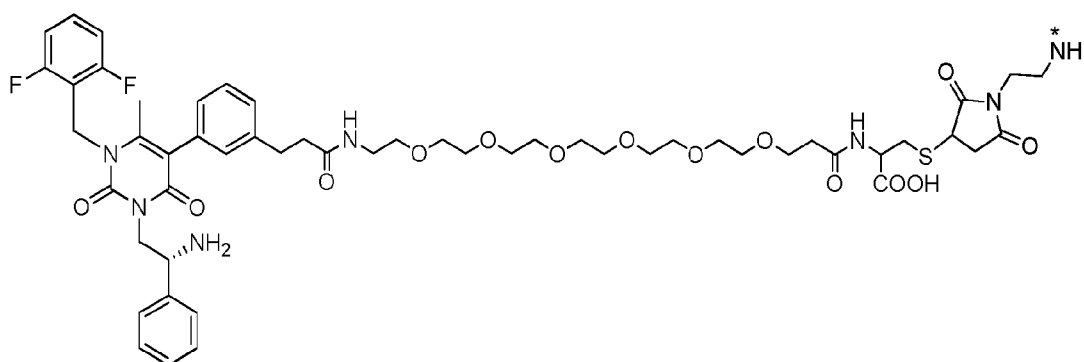
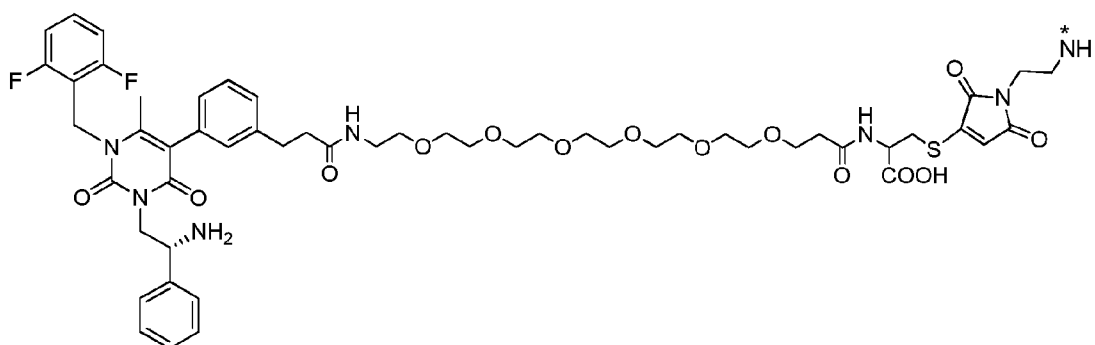


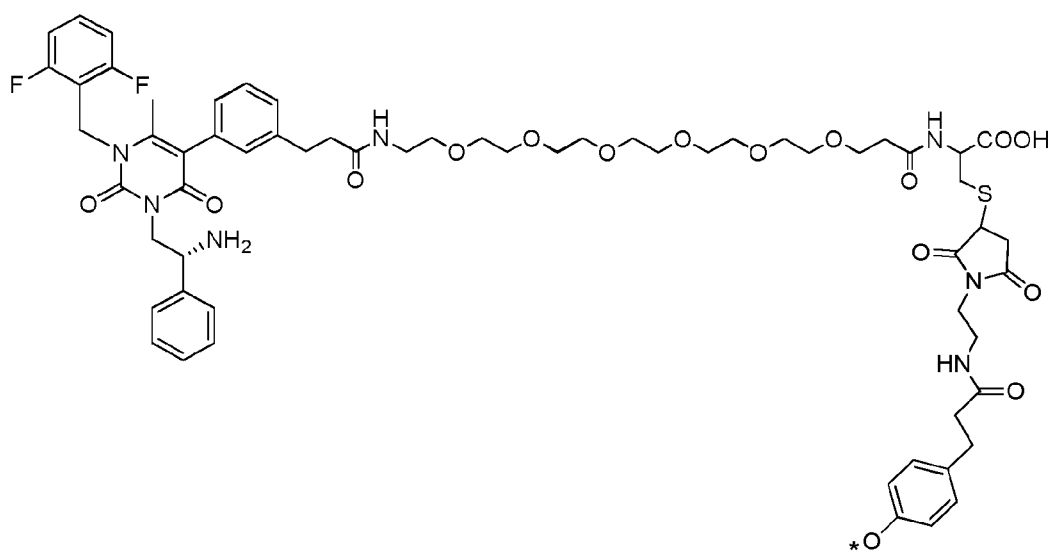
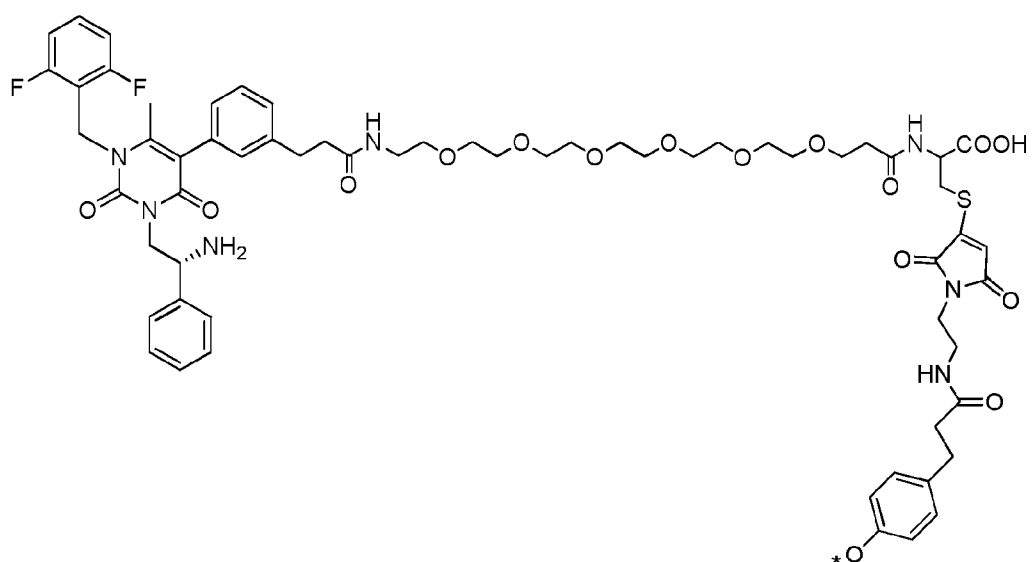
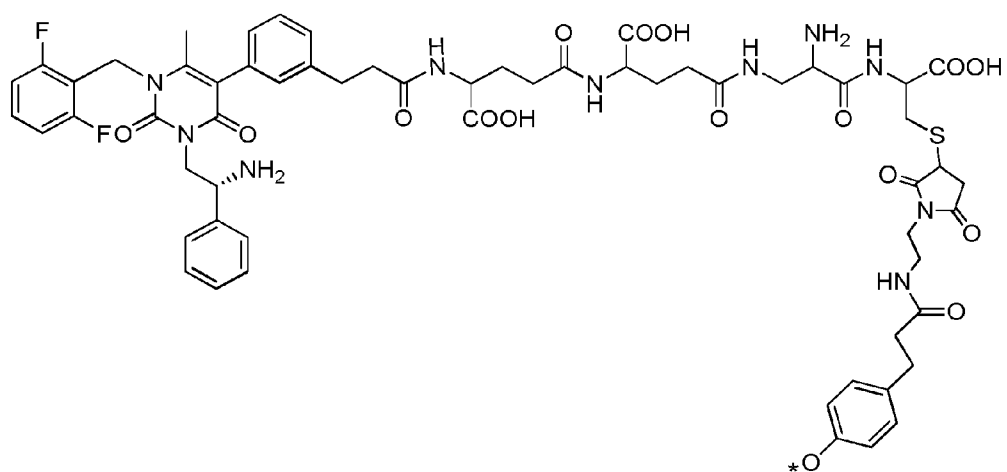
30 en donde * representa un enlace covalente con L.

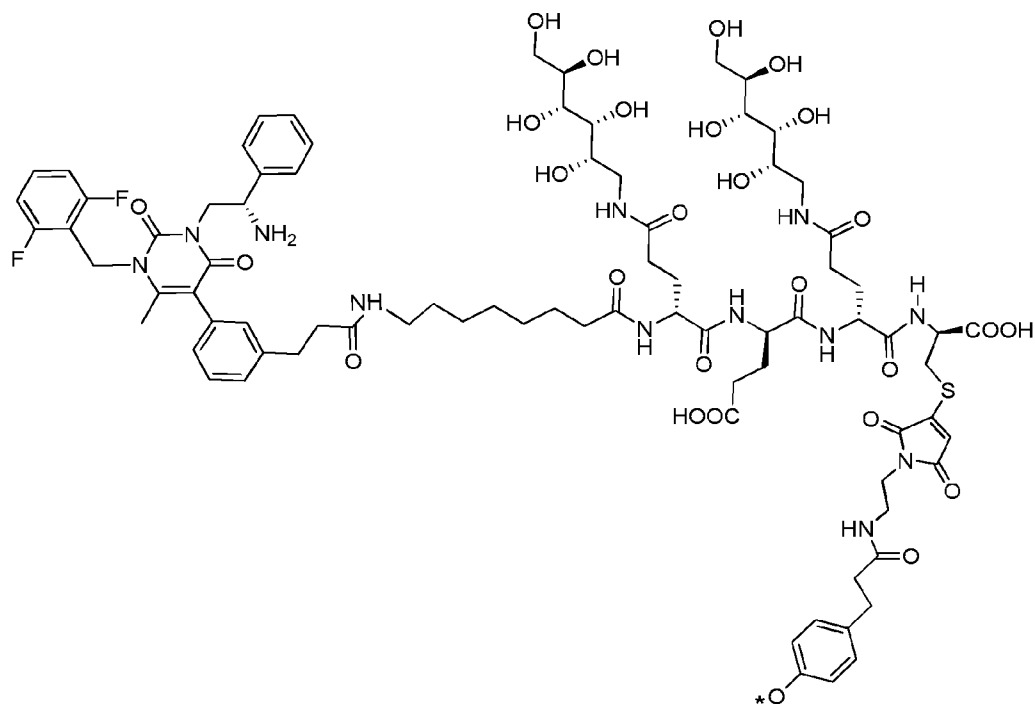
8. El conjugado de la reivindicación 1(c) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^7 y R^8 son H; y t es 2.

35 9. El conjugado de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la fórmula

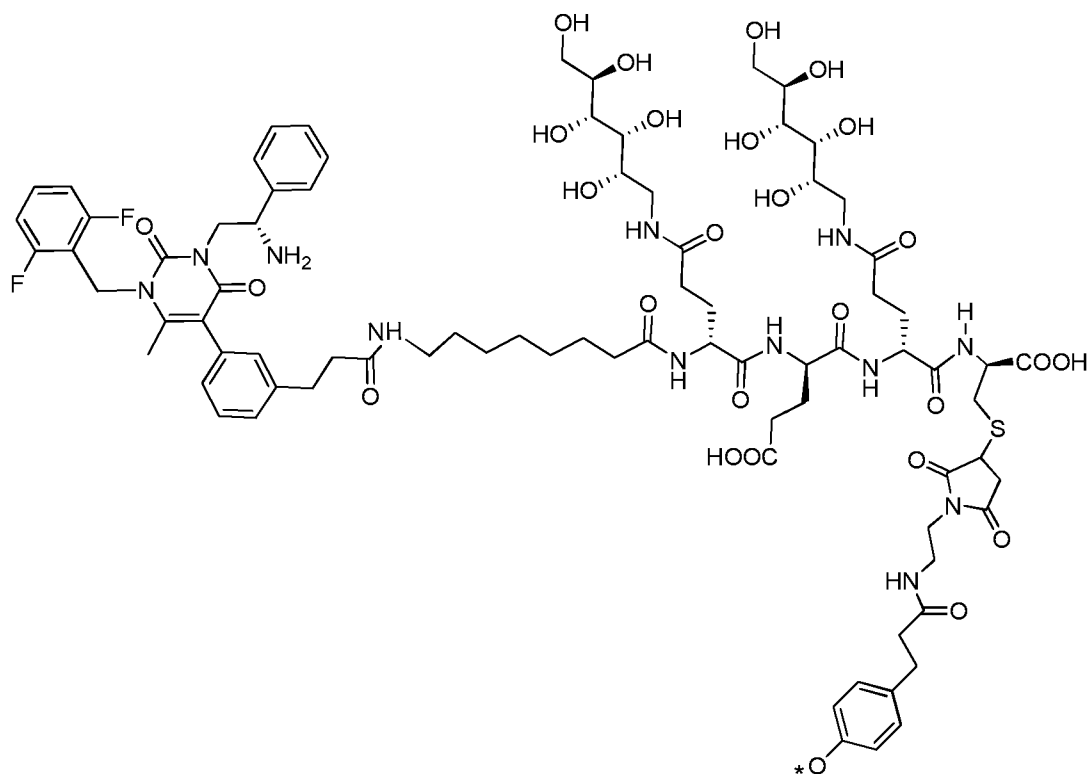








o



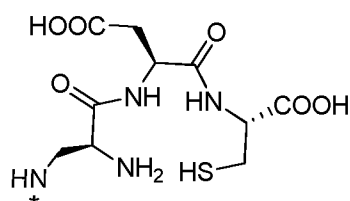
5 en donde * representa un enlace covalente con el resto del conjugado.

10. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde A es un fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en un alcaloide de vinca, una criptocina, bortezomib, tiobortezomib, una tubulicina, aminopterina, rapamicina, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, everolimus, α -amanatina, verucarina, didemina B, geldanomicina, purvalanol A, ispinesib, budesonida, dasatinib, una epotilona, una maitansina y un inhibidor de tirosina quinasa, preferentemente en donde el fármaco es una tubulicina.

11. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde A es

a) un agente de formación de imágenes, preferentemente un agente de formación de imágenes seleccionado del grupo que consiste en un colorante de rodamina, un colorante de fluoresceína, un agente de formación de imágenes PET, o un agente radiomarcado en donde A se selecciona preferentemente del grupo que consiste en S0456, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), rodamina B, rodamina 6G, TRITC, Rojo Texas, rodamina 123, sulforodamina 101, fluoresceína, 5-amino-fluoresceína, 6-amino-fluoresceína, isocianato de fluoresceína (FITC), NHS-fluoresceína, Verde Oregón, Verde Tokio, Verde Singapur y Verde Filadelfia; o

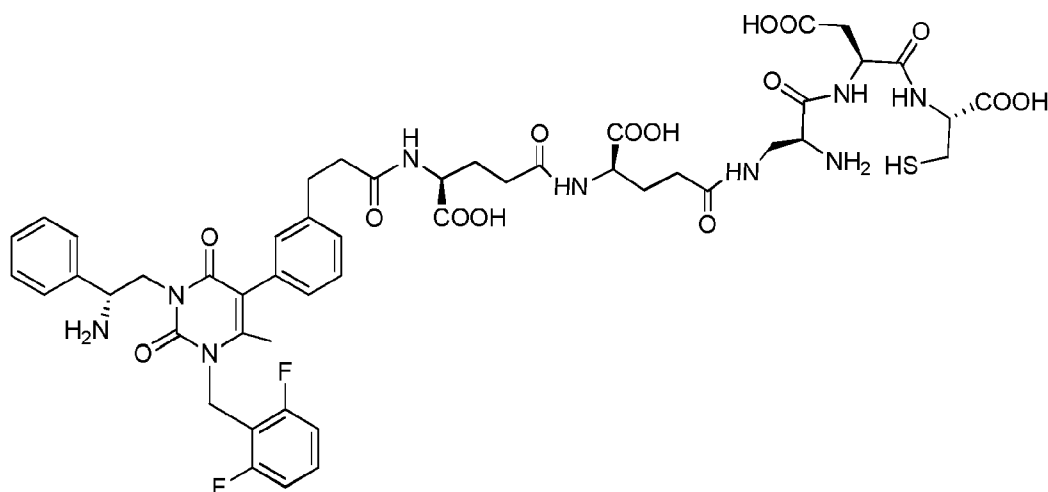
b) un isótopo radiactivo, tal como un isótopo radiactivo de un metal, coordinado a un grupo quelante, en donde el grupo quelante es preferentemente de la fórmula



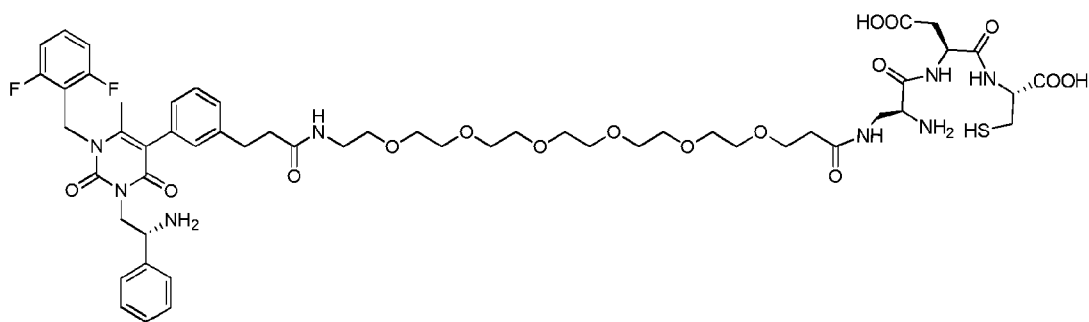
en donde * representa un enlace covalente con el resto del conjugado; o en donde el grupo quelante comprende preferentemente un isótopo metálico radiactivo seleccionado del grupo que consiste en un isótopo de tecnecio, renio, galio, gadolinio, indio y cobre coordinados con el mismo; o el grupo quelante comprende preferentemente un isótopo metálico radiactivo seleccionado del grupo que consiste en ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga coordinados con el mismo

12. El conjugado de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en

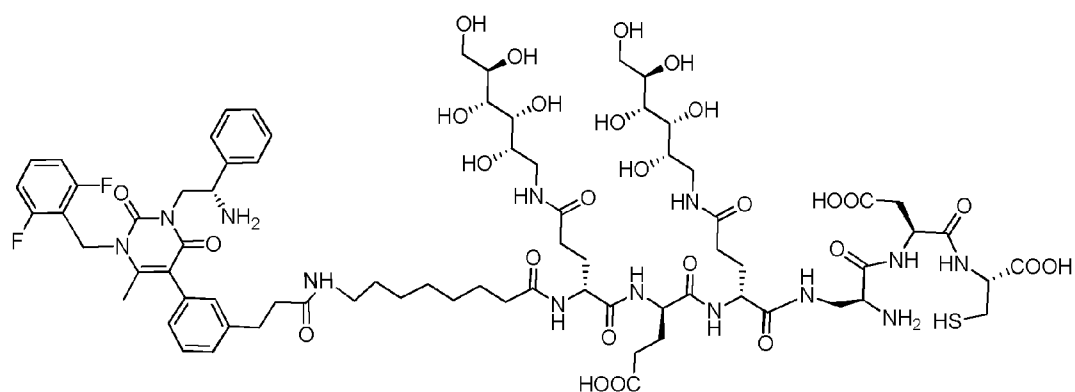
(a)



(b)

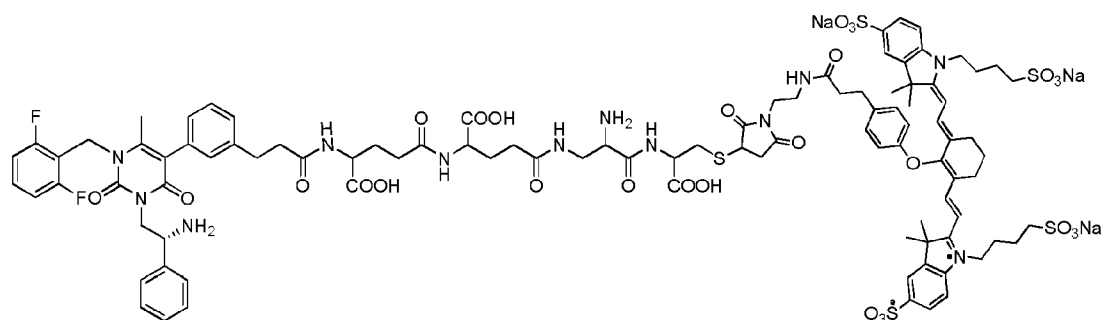


(c)

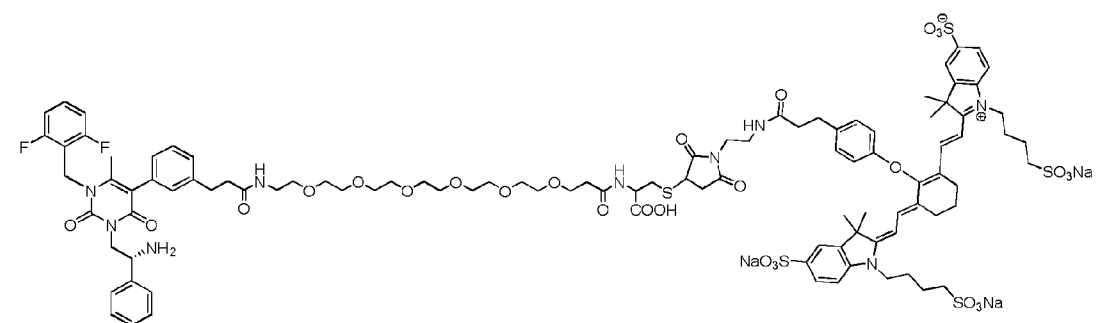


5 en donde en (a), (b) o (c) el conjugado comprende un isótopo metálico radiactivo seleccionado del grupo que consiste en ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga y ^{68}Ga coordinado con el mismo, preferentemente $^{99\text{m}}\text{Tc}$,

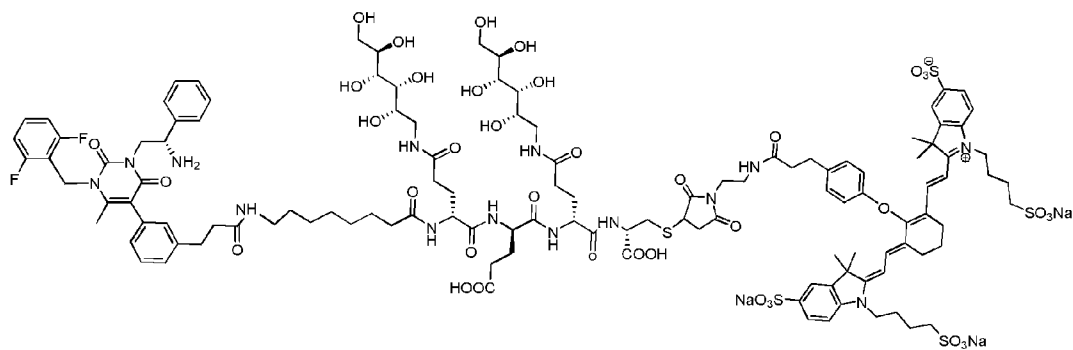
(d)



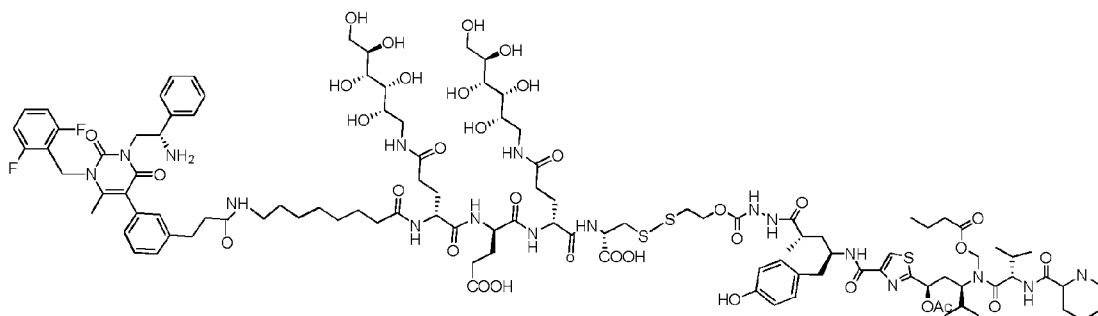
(e)



(f)



(g)



5 y una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a)-(g).

13. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y opcionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

14. Un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o 12(g), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para tratar el cáncer que expresa LHRH-R en un sujeto, en donde el método preferentemente comprende administrar al sujeto una cantidad del conjugado eficaz para tratar el cáncer que expresa LHRH-R, en donde el cáncer que expresa LHRH-R se selecciona preferentemente del grupo que consiste en próstata, endometrial, piel, pancreático, mama, riñón, cáncer de ovario y cerebro.

15

15. Un método para la formación de imágenes de una población de células *in vitro*, que comprende

20

- poner en contacto las células con un conjugado según la reivindicación 1-9 u 11, para proporcionar células marcadas, y
- visualizar las células marcadas.

16. Un método para la formación de imágenes de una población de células *in vivo*, que comprende

25

- administrar a un paciente una cantidad eficaz de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 u 11 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para proporcionar células marcadas; y
- visualizar las células marcadas mediante formación de imágenes.

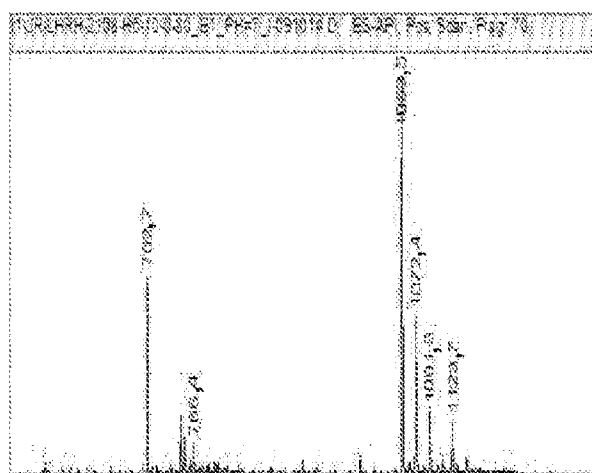
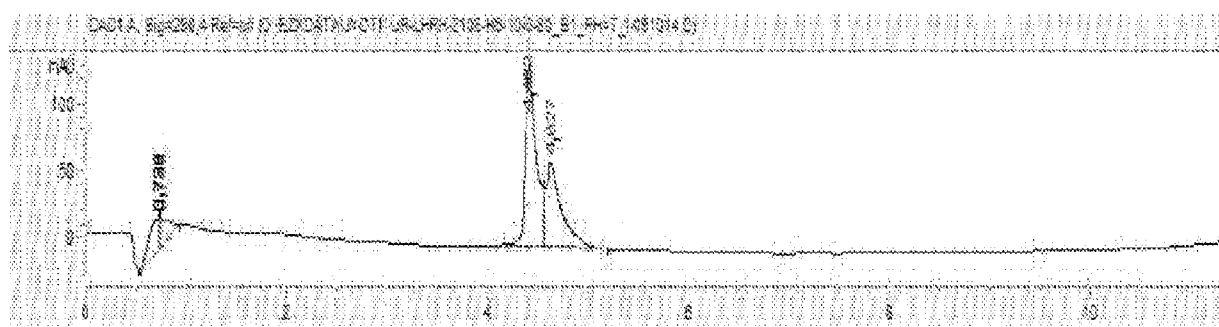
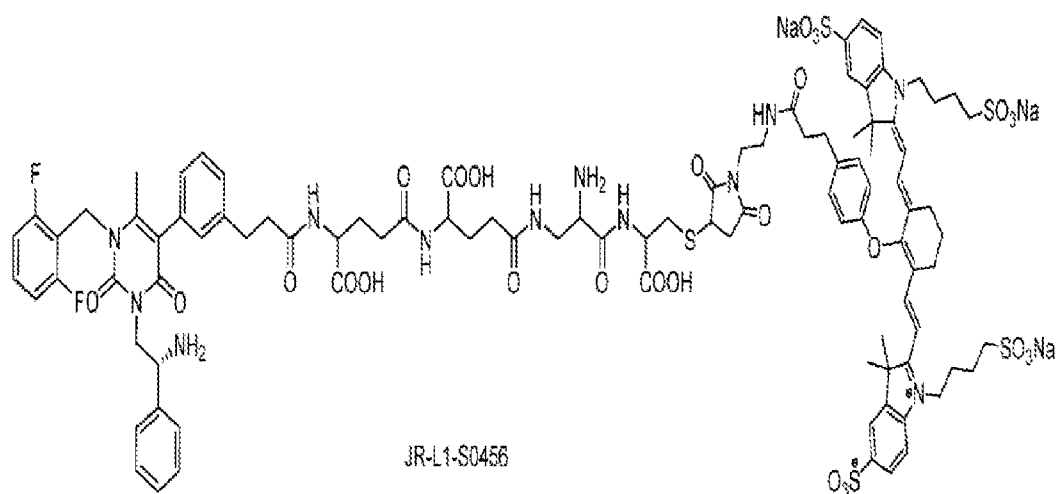


Fig. 1

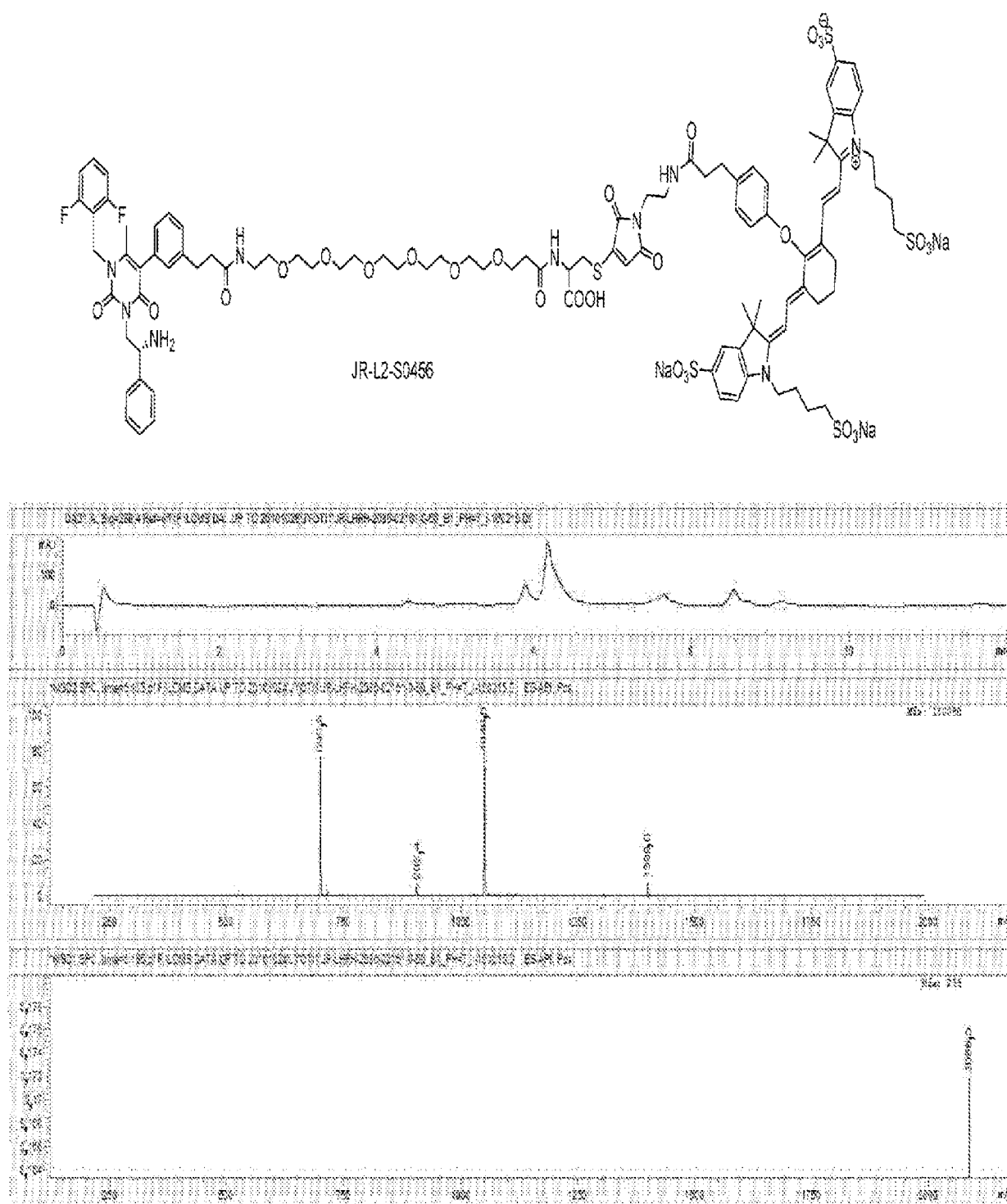


Fig. 2

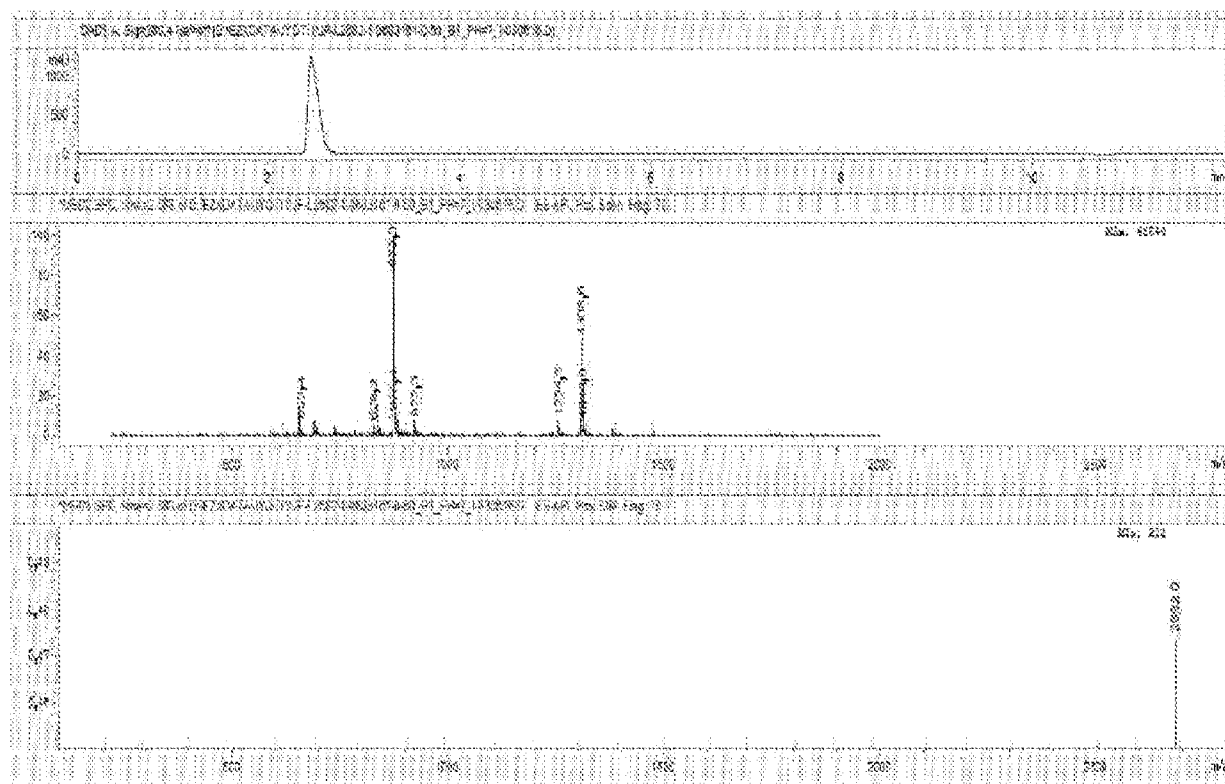
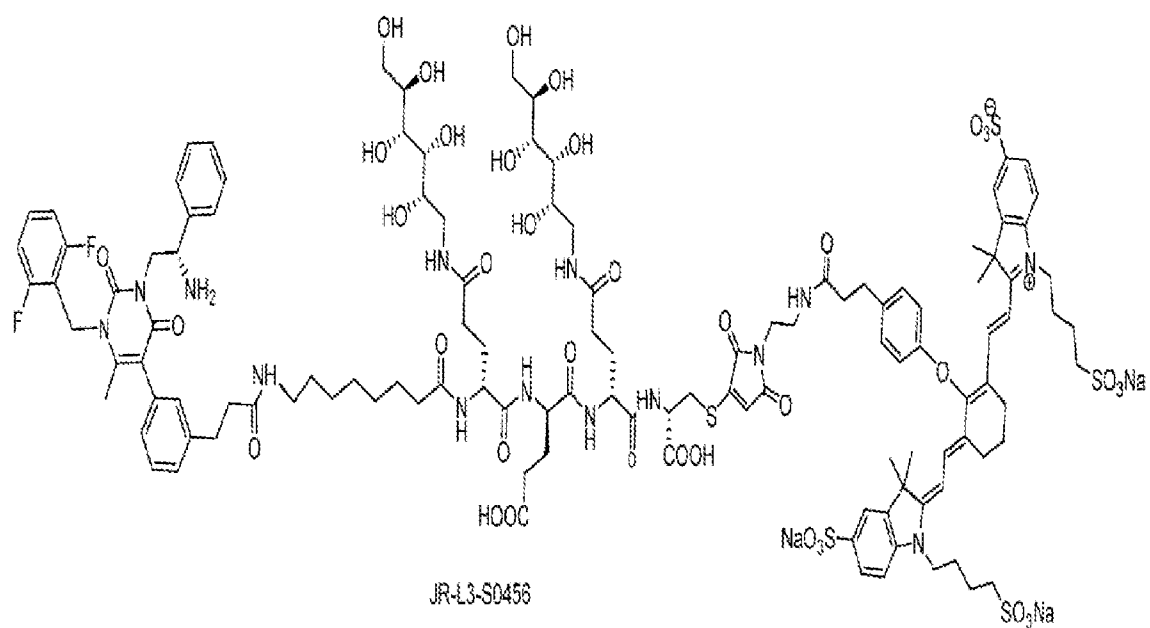


Fig. 3

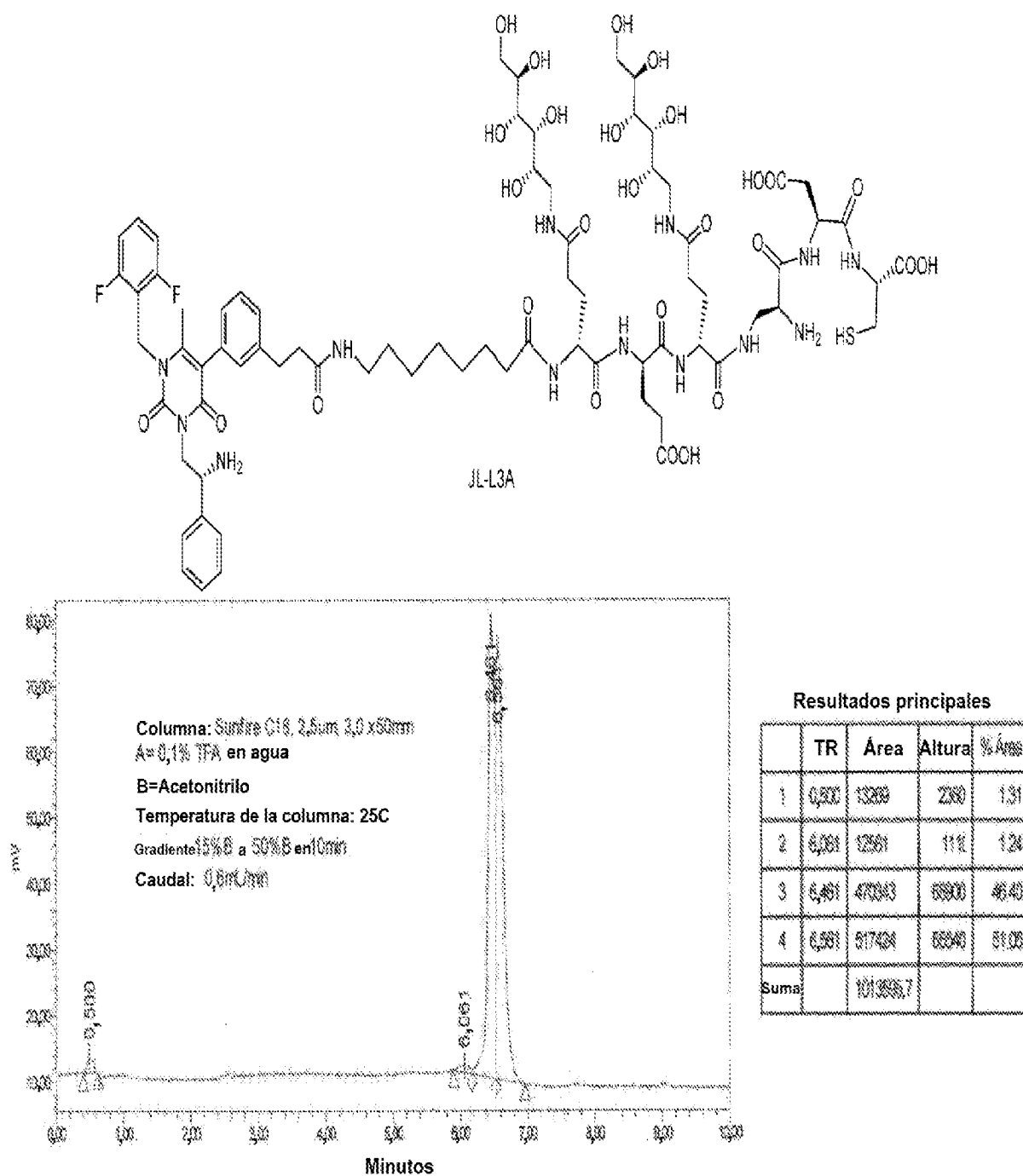


Fig. 4

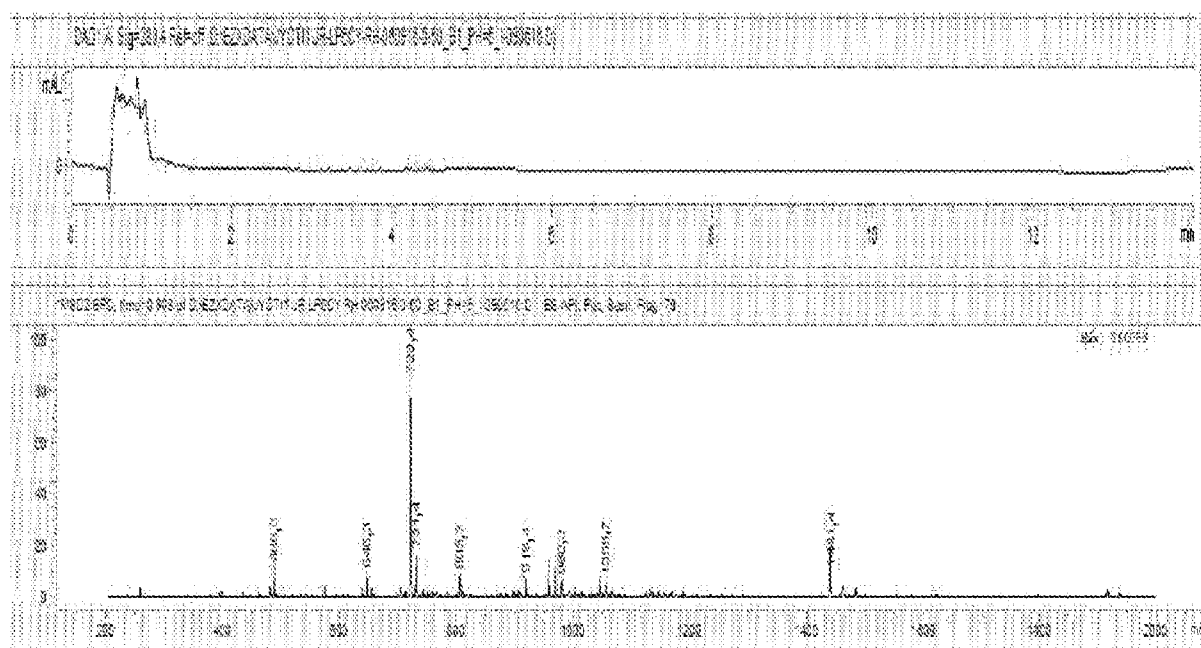
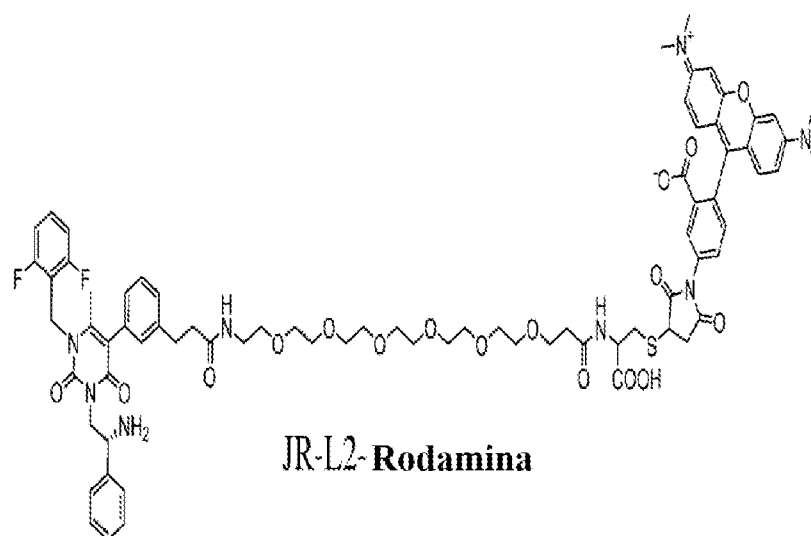


Fig. 5

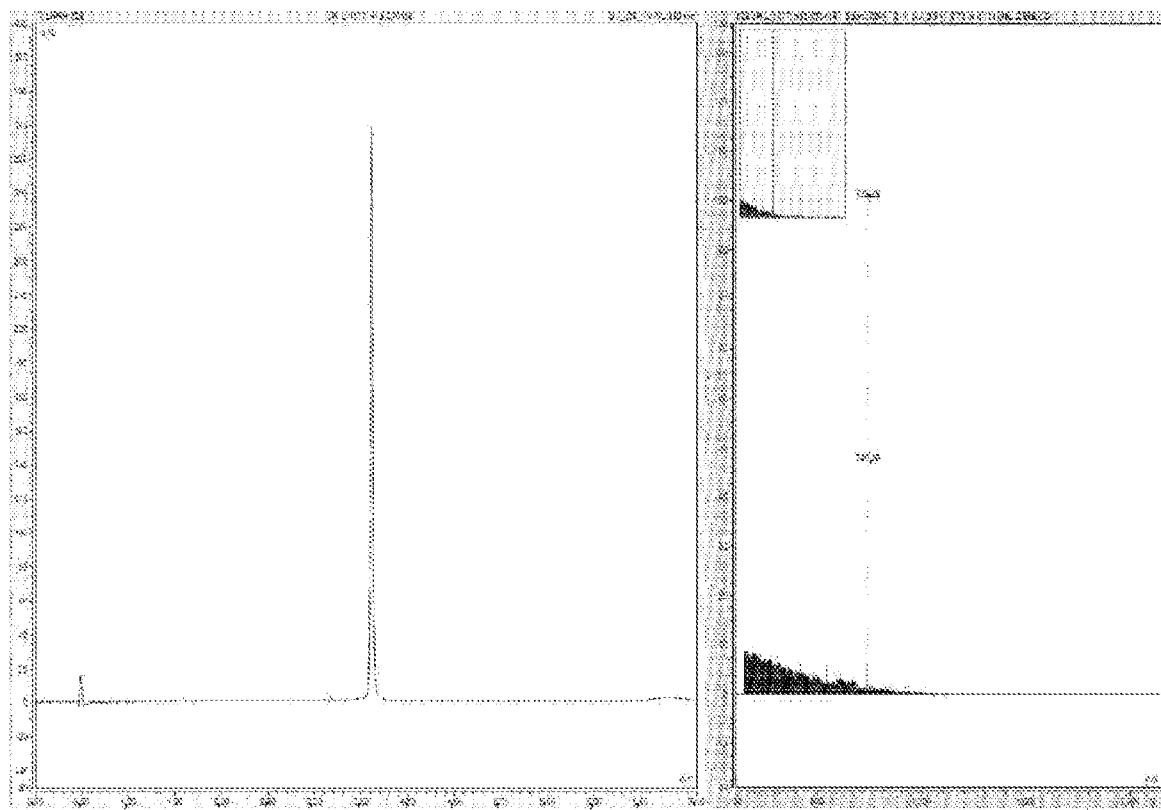
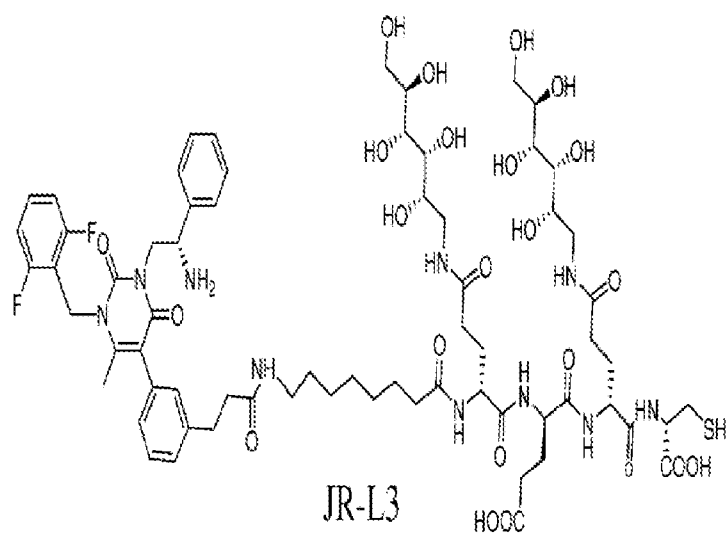
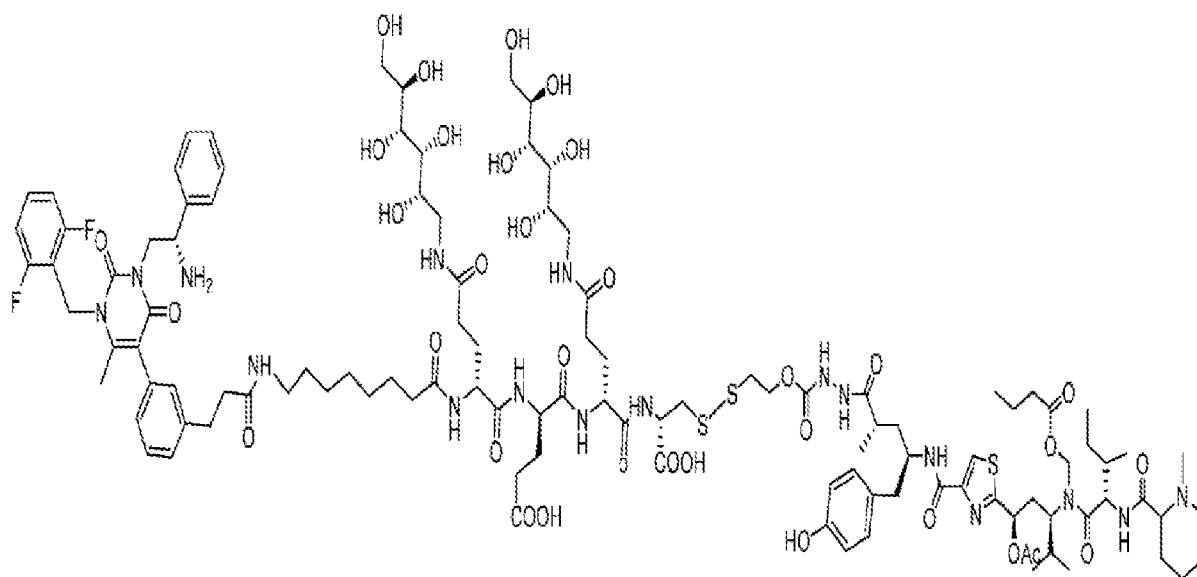


Fig. 6



JR-L3-TubBH

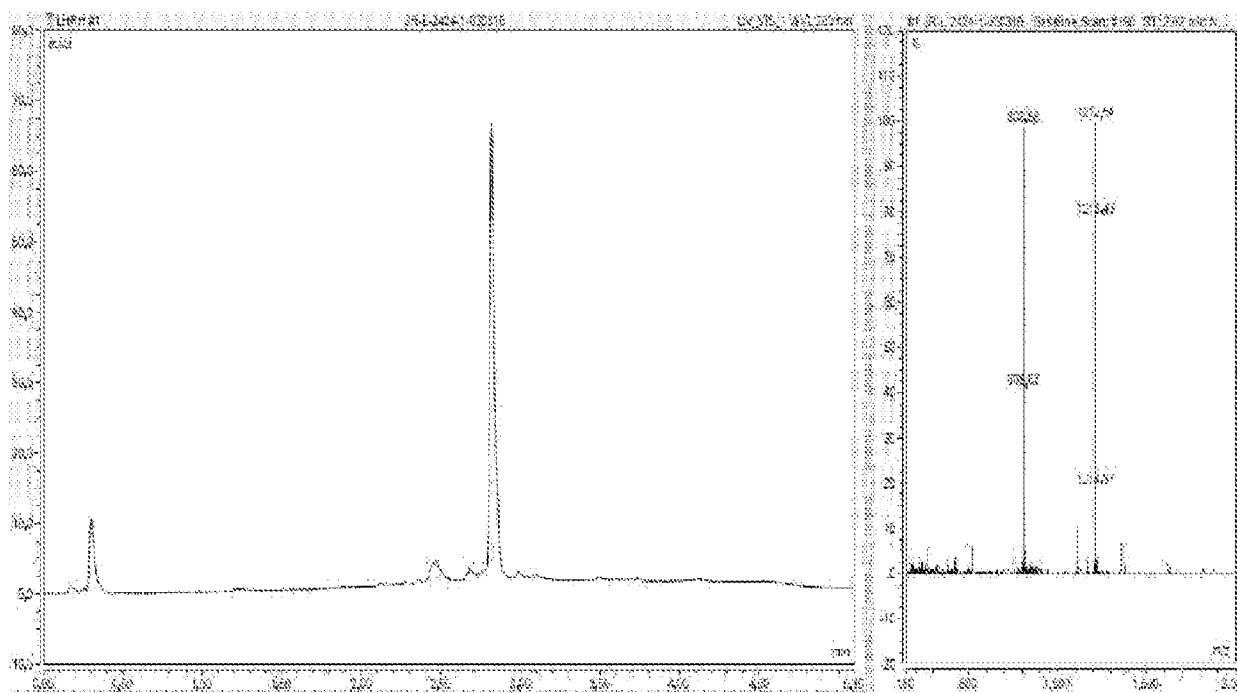


Fig. 7

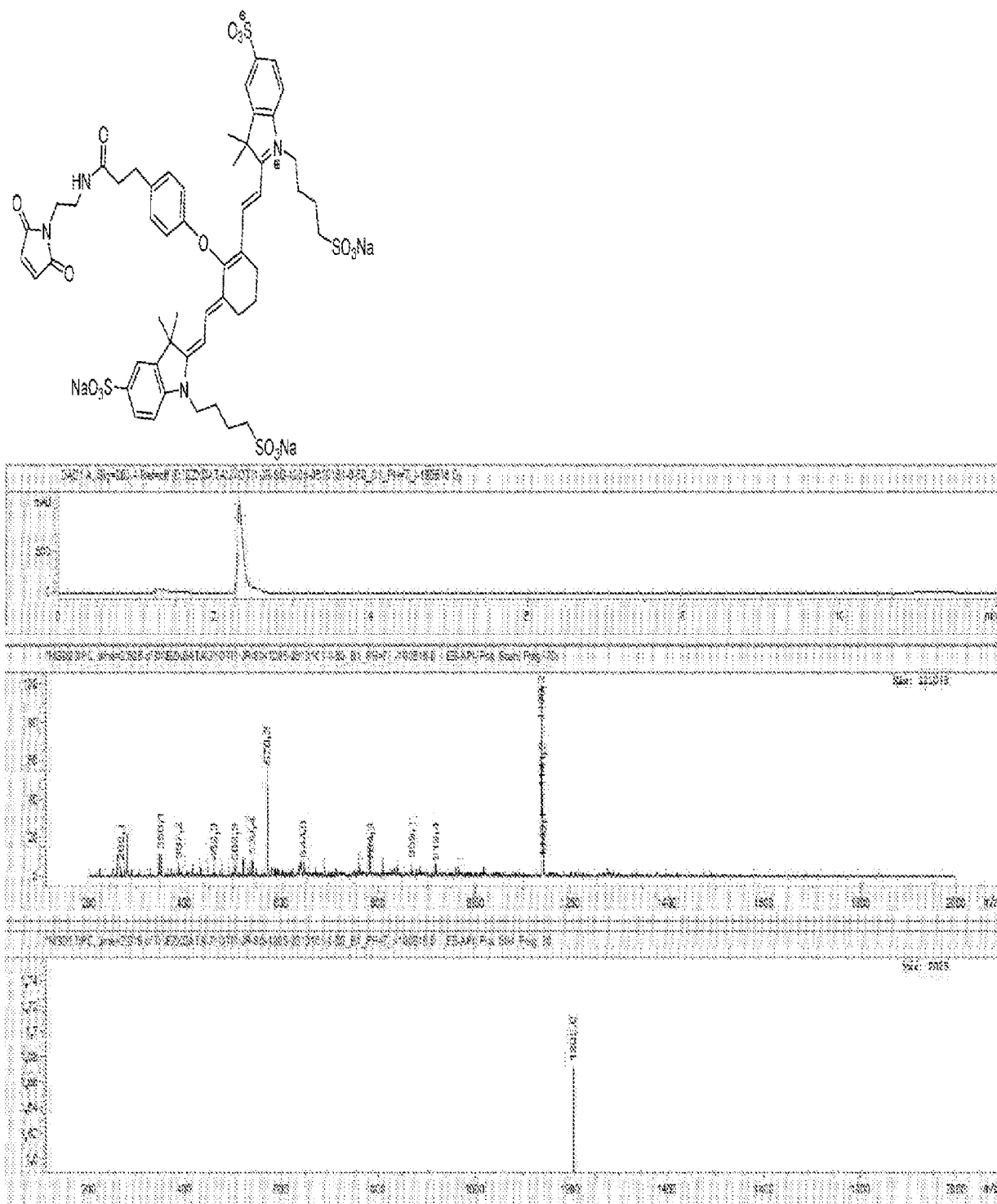


Fig. 8

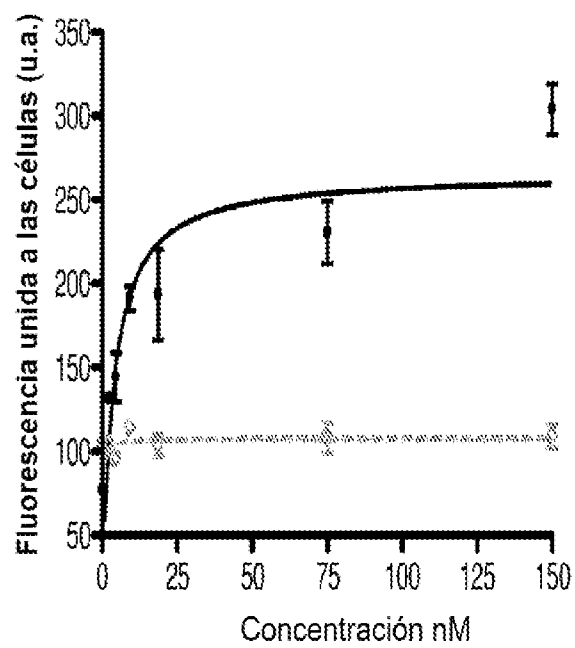
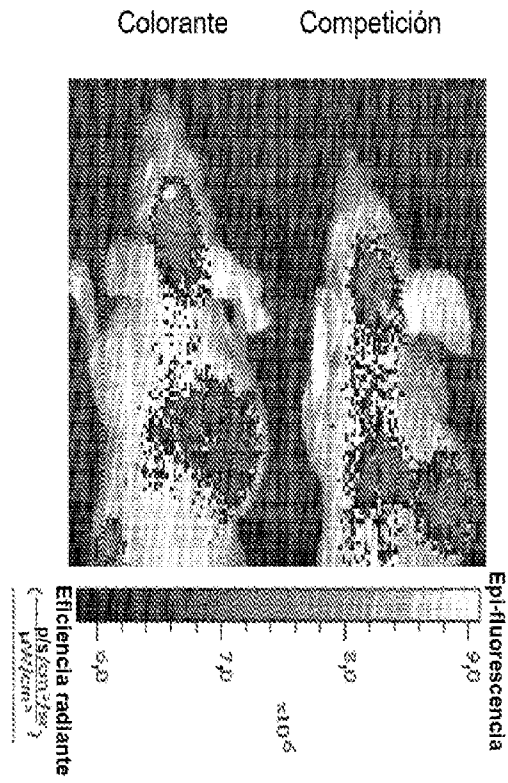


Fig. 9

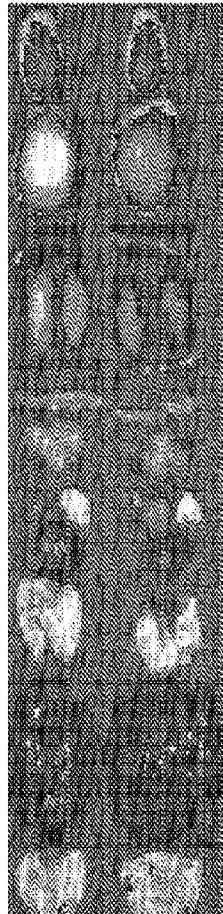
A



B

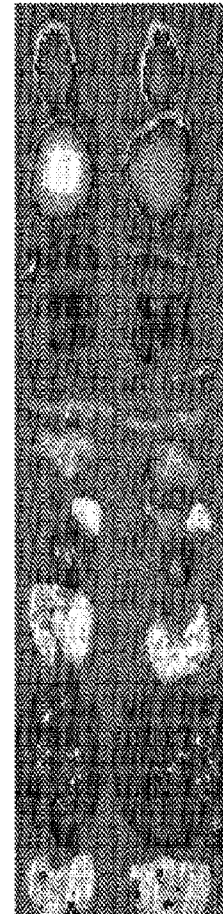
Antes de extirpar el riñón

Colorante Competición

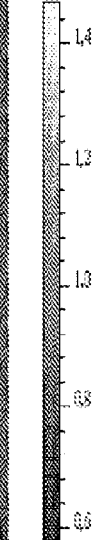


Después de extirpar el riñón

Colorante Competición



Epi-fluorescencia



Eficiencia radiante
(p/s/cm²/sr)

Fig. 10

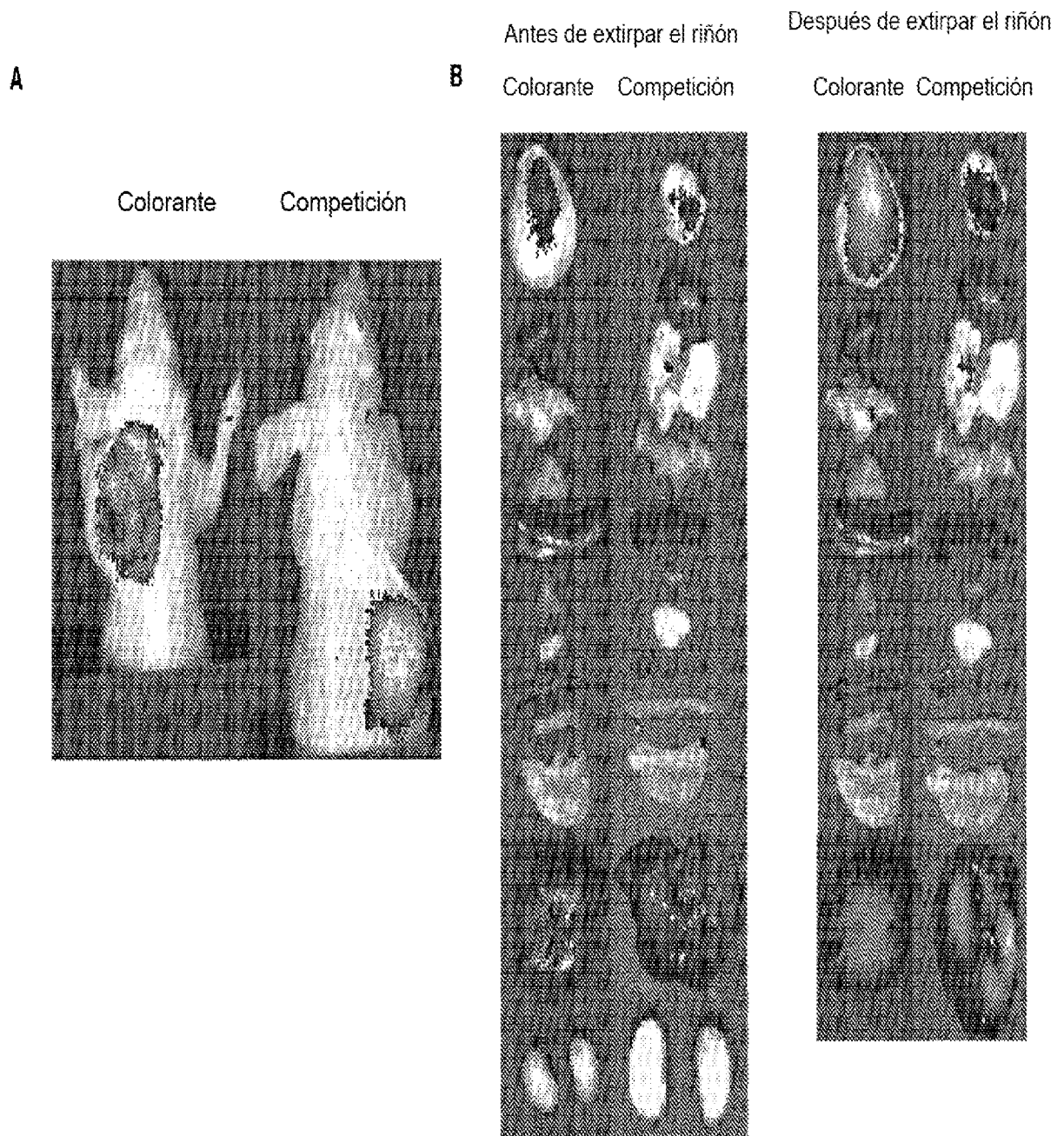
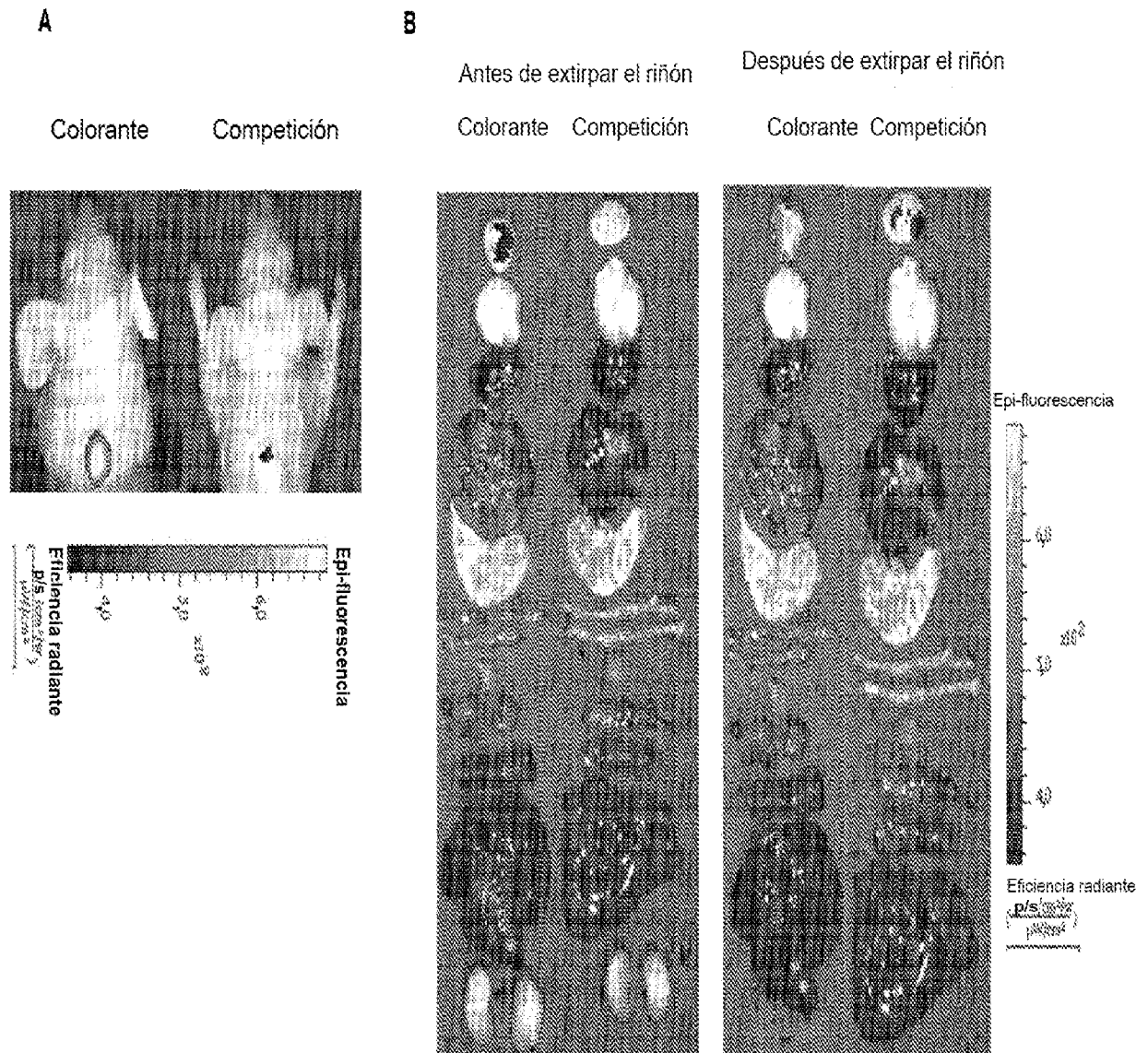


Fig. 11



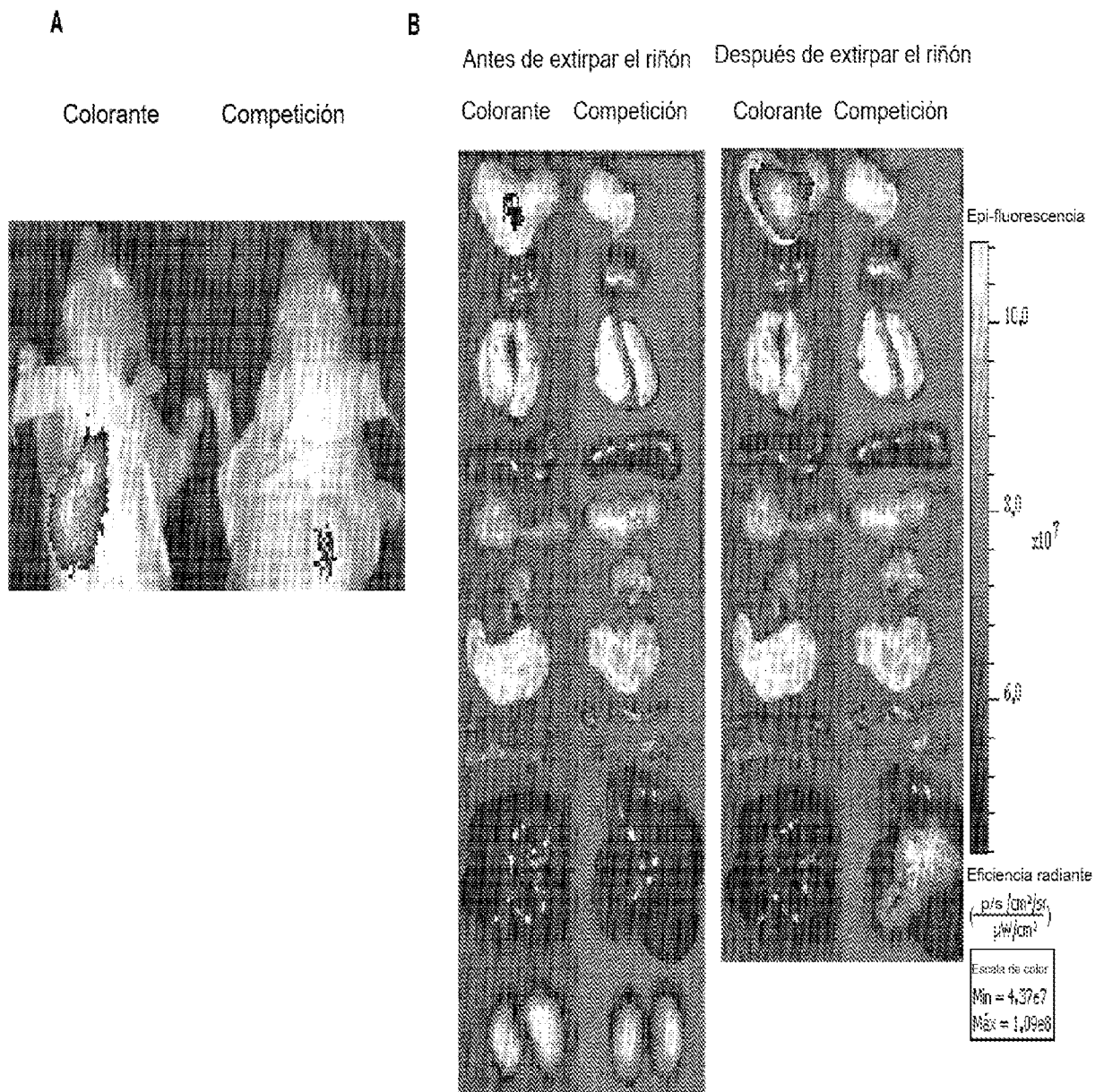
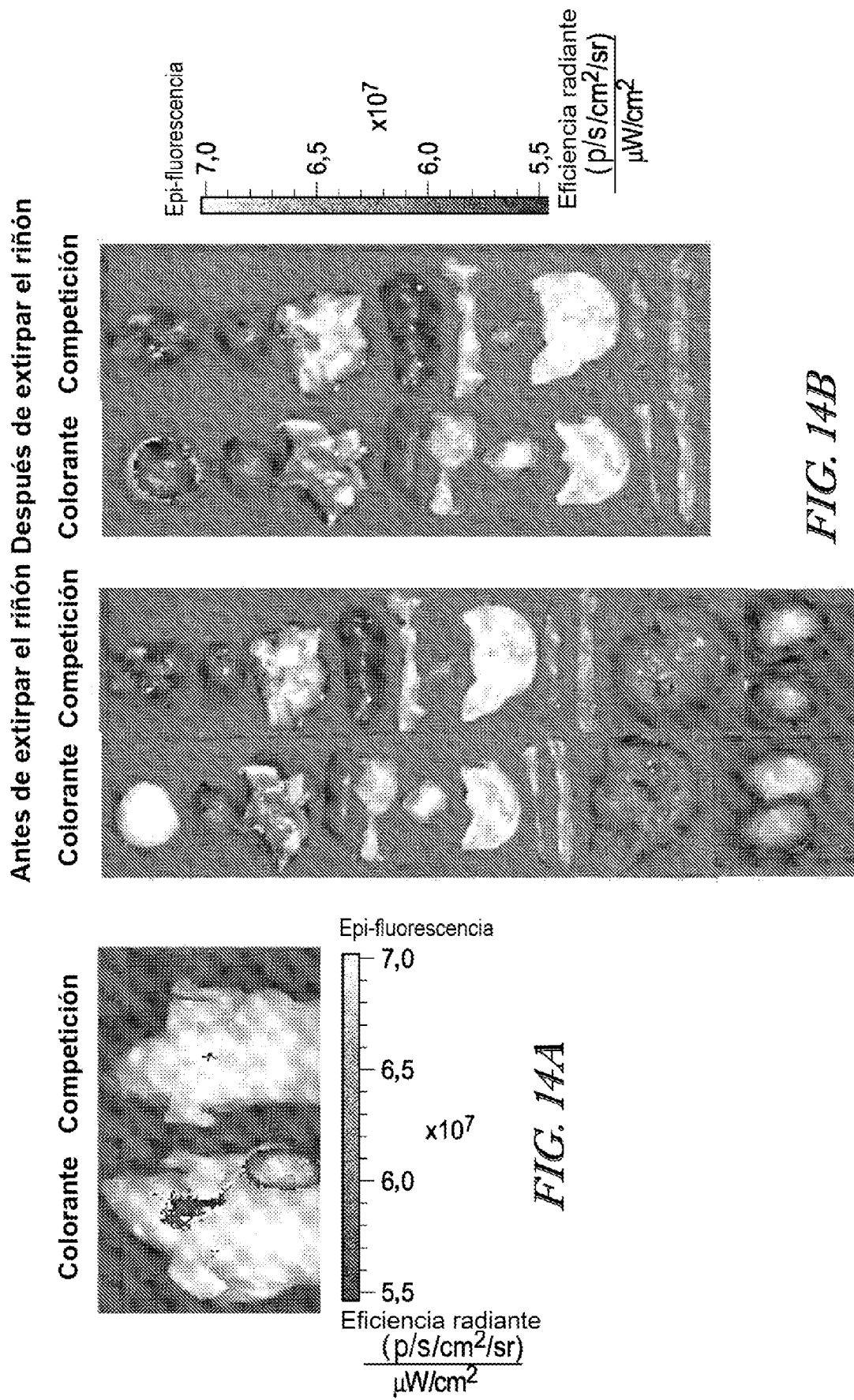


Fig. 13



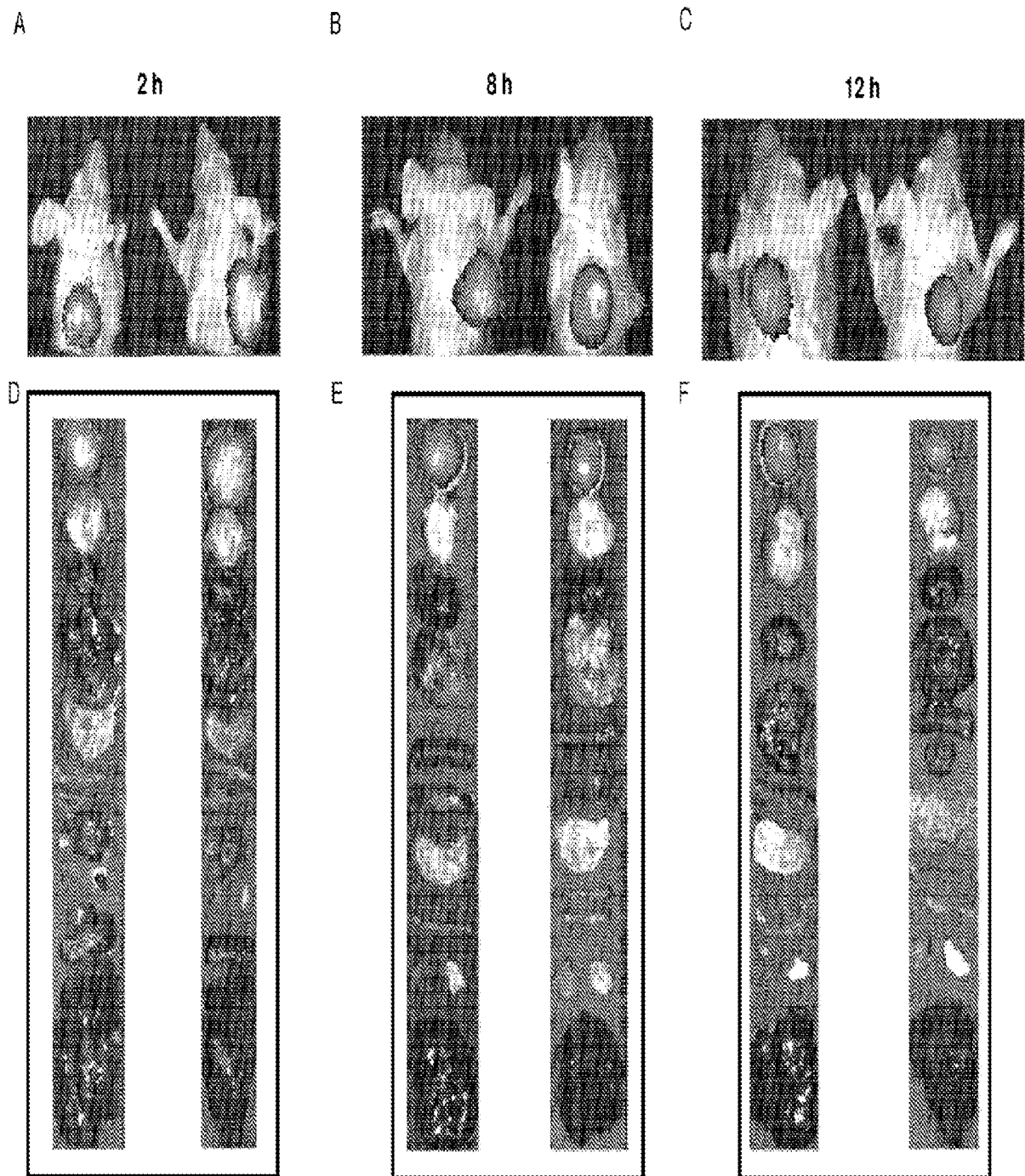


Fig. 15

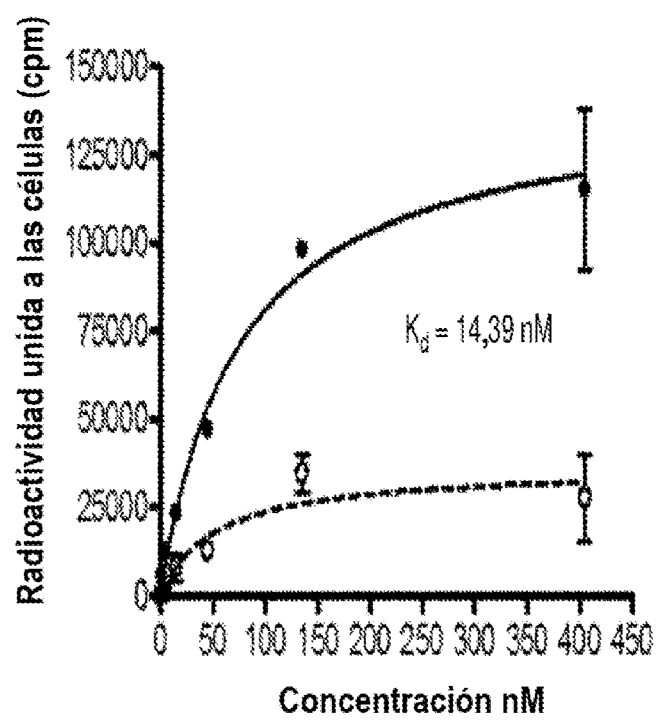


Fig. 16

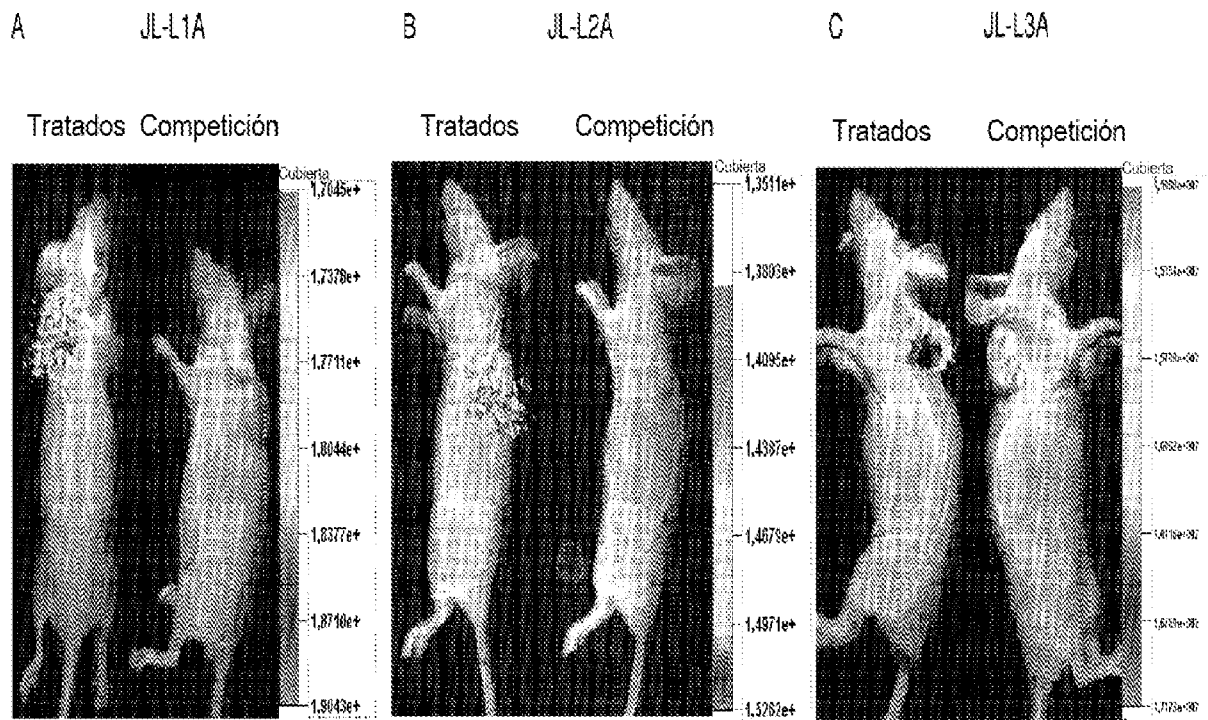


Fig. 17

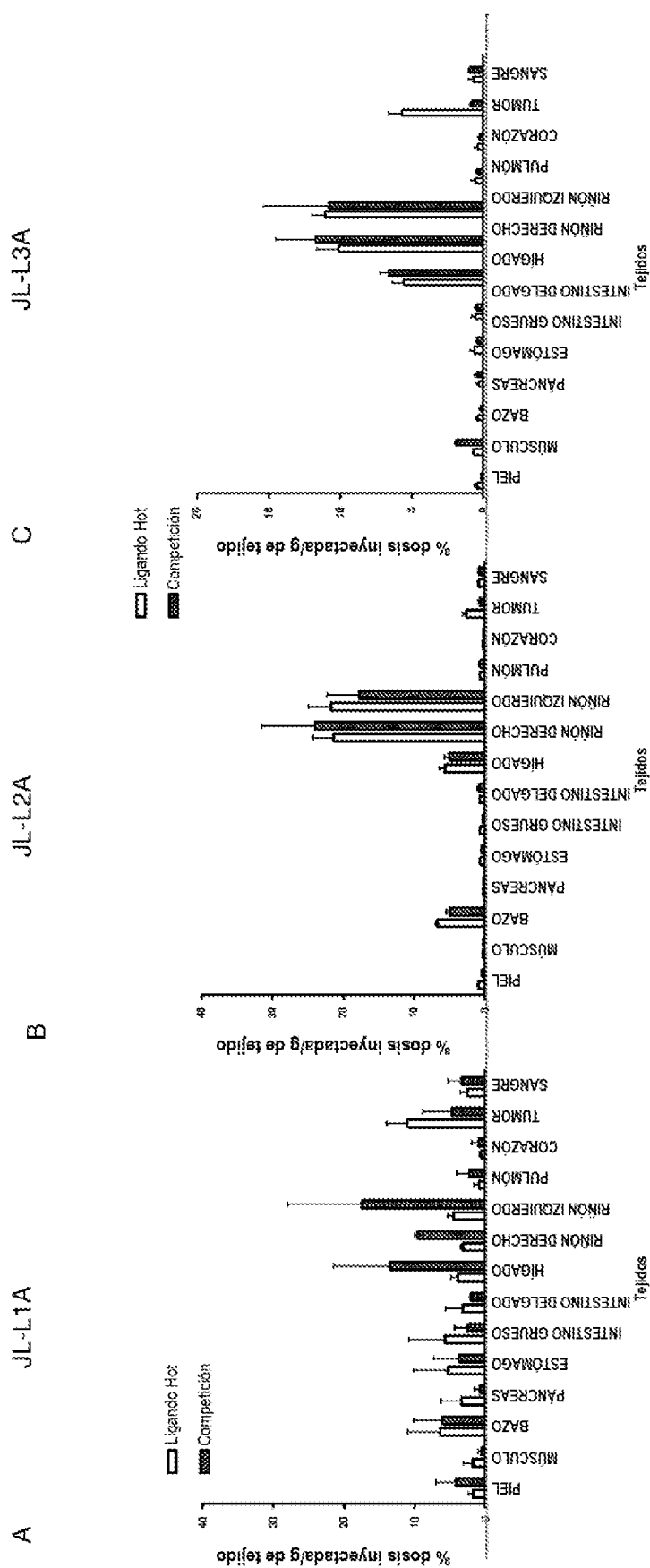
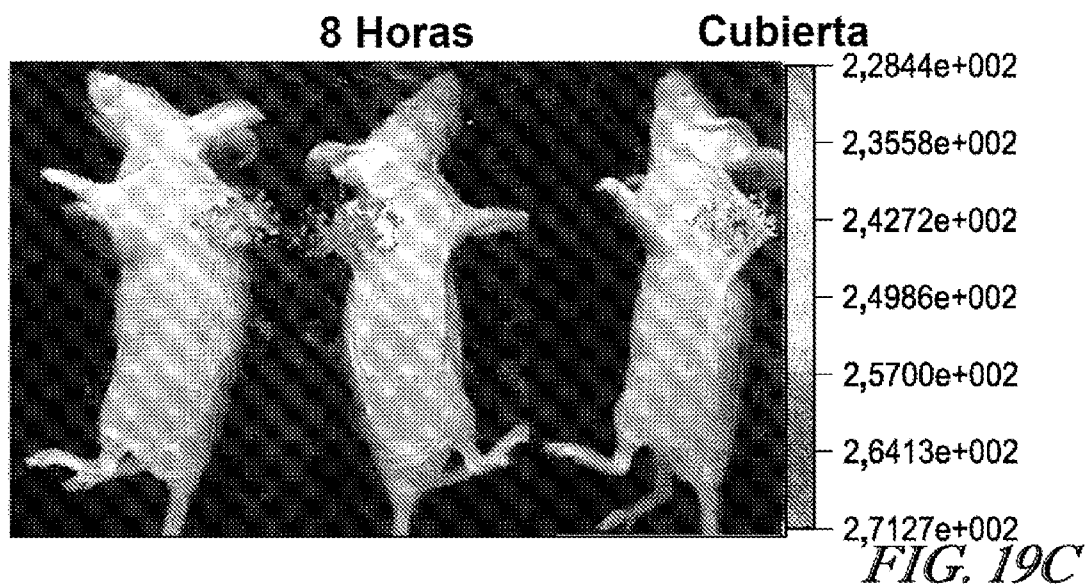
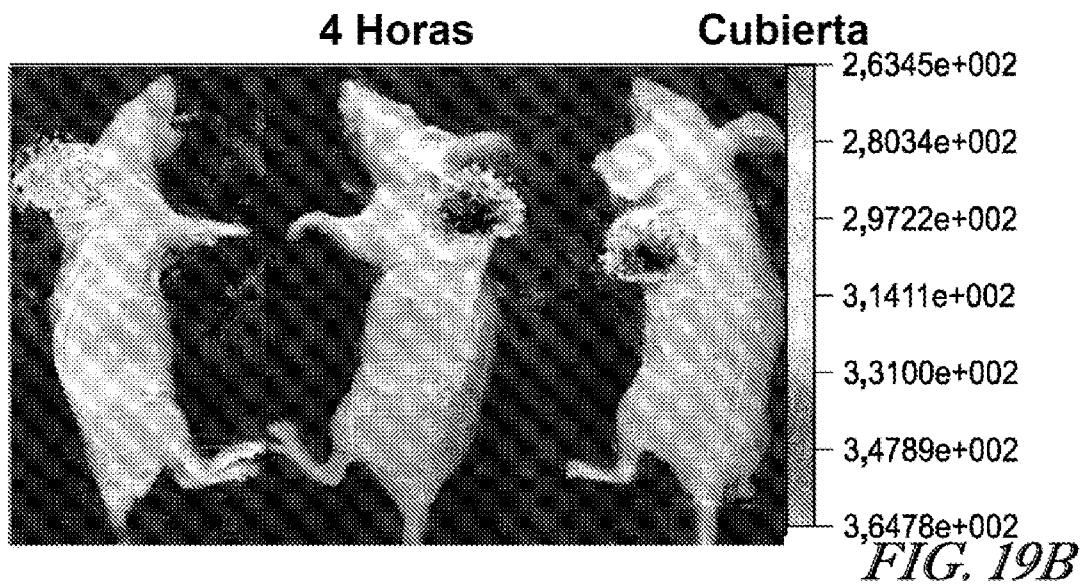
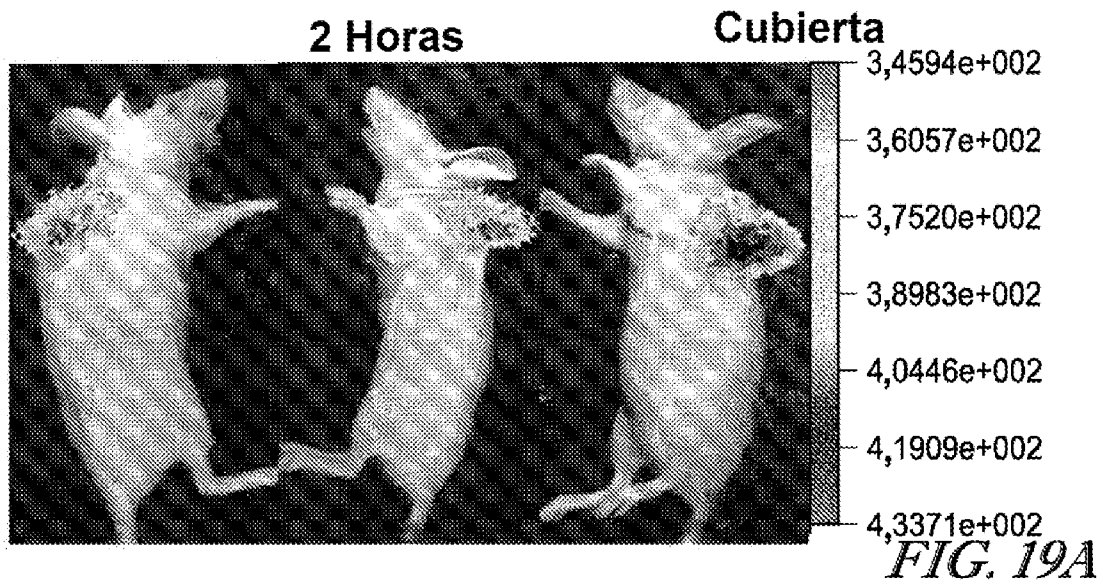
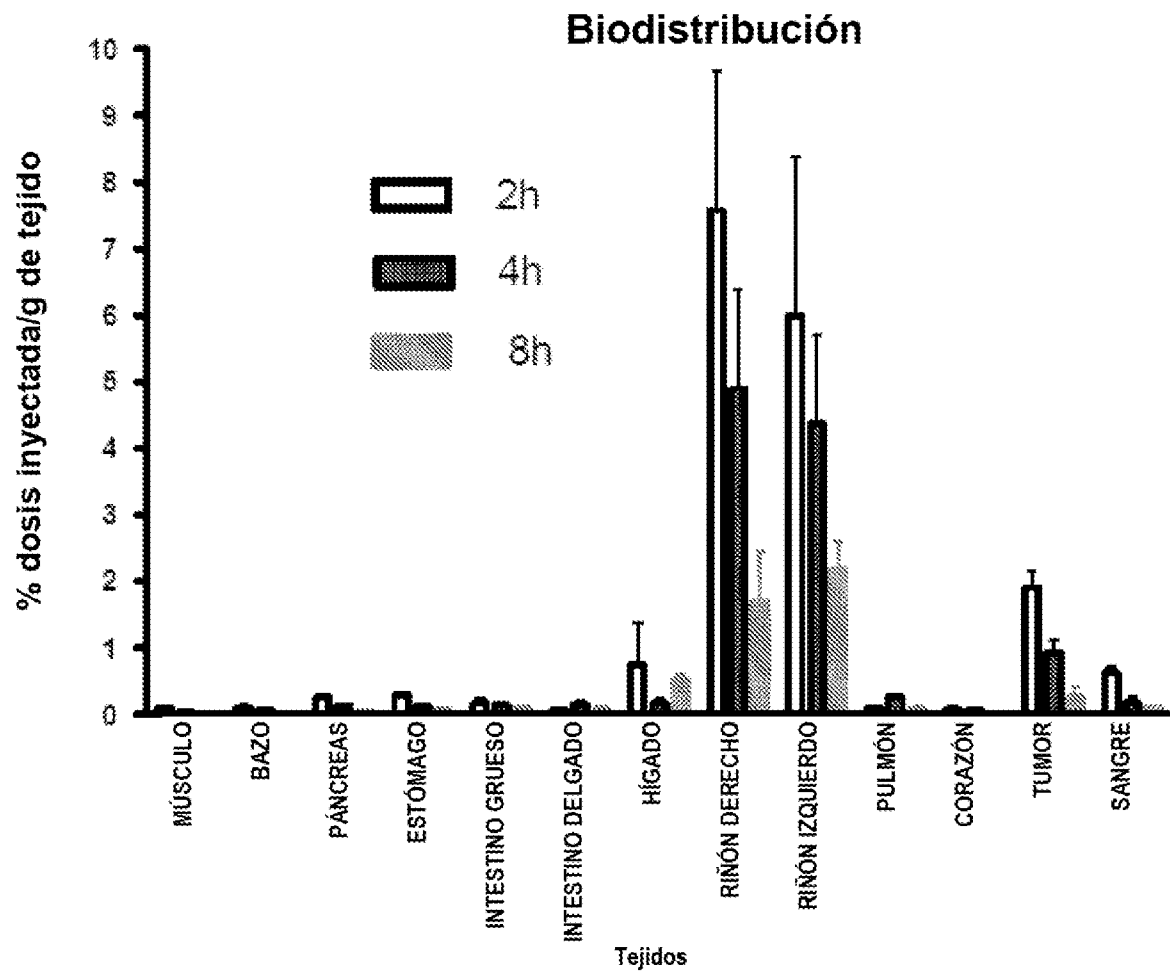


Fig. 18



*FIG. 19D*

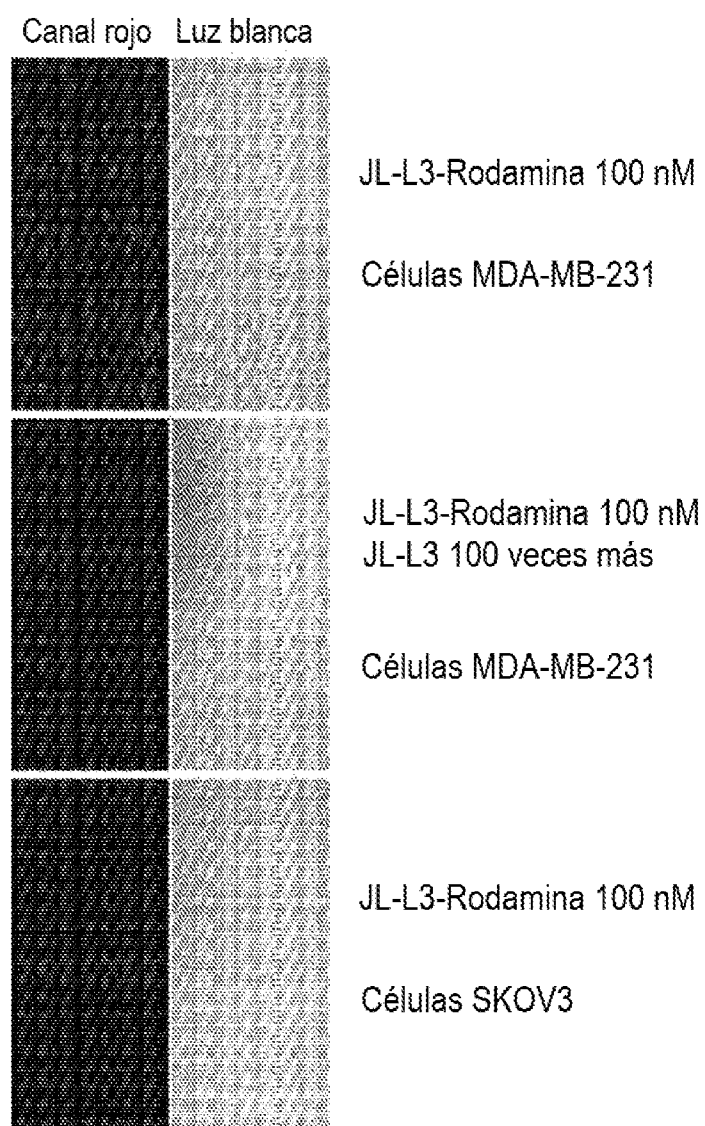


Fig. 20

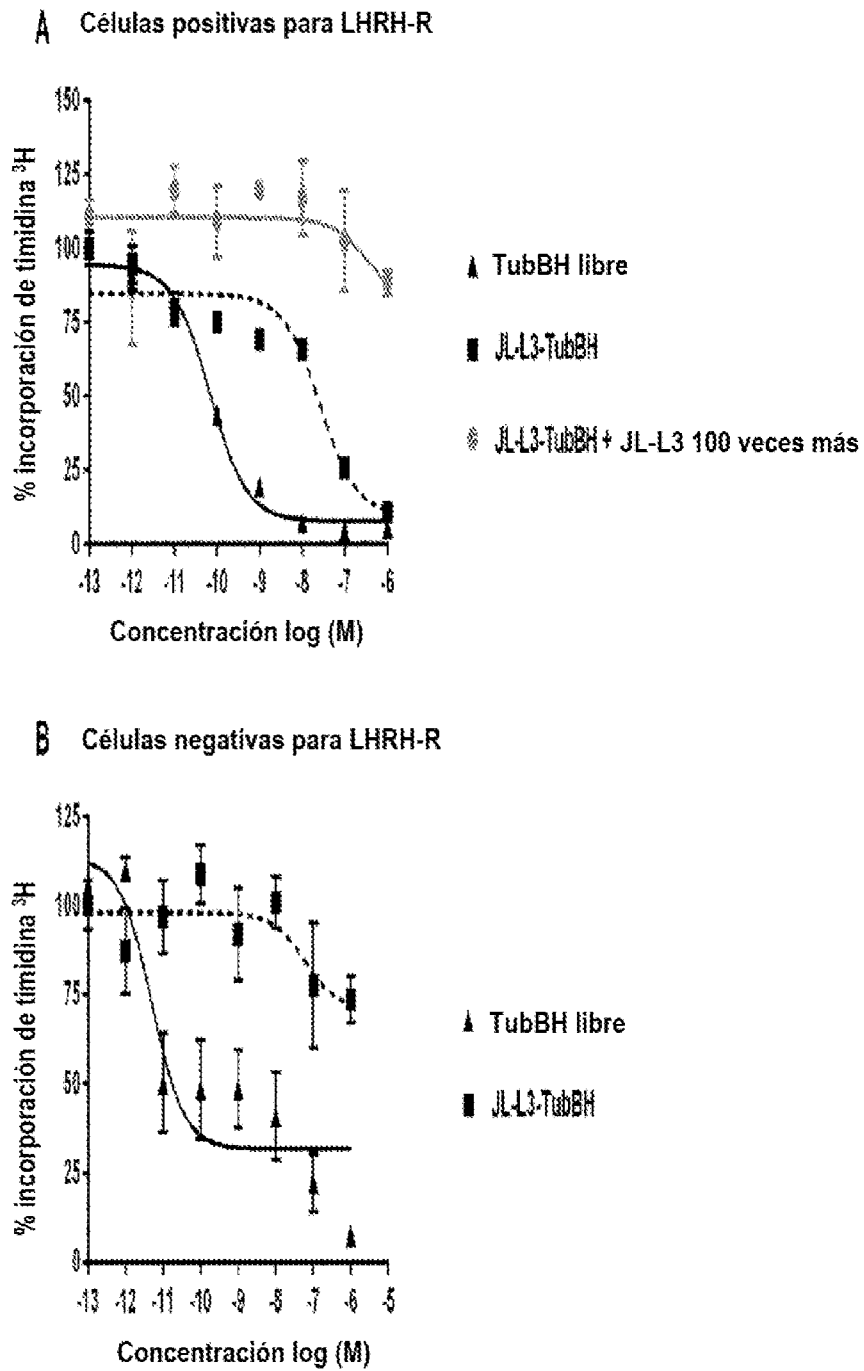


Fig. 21

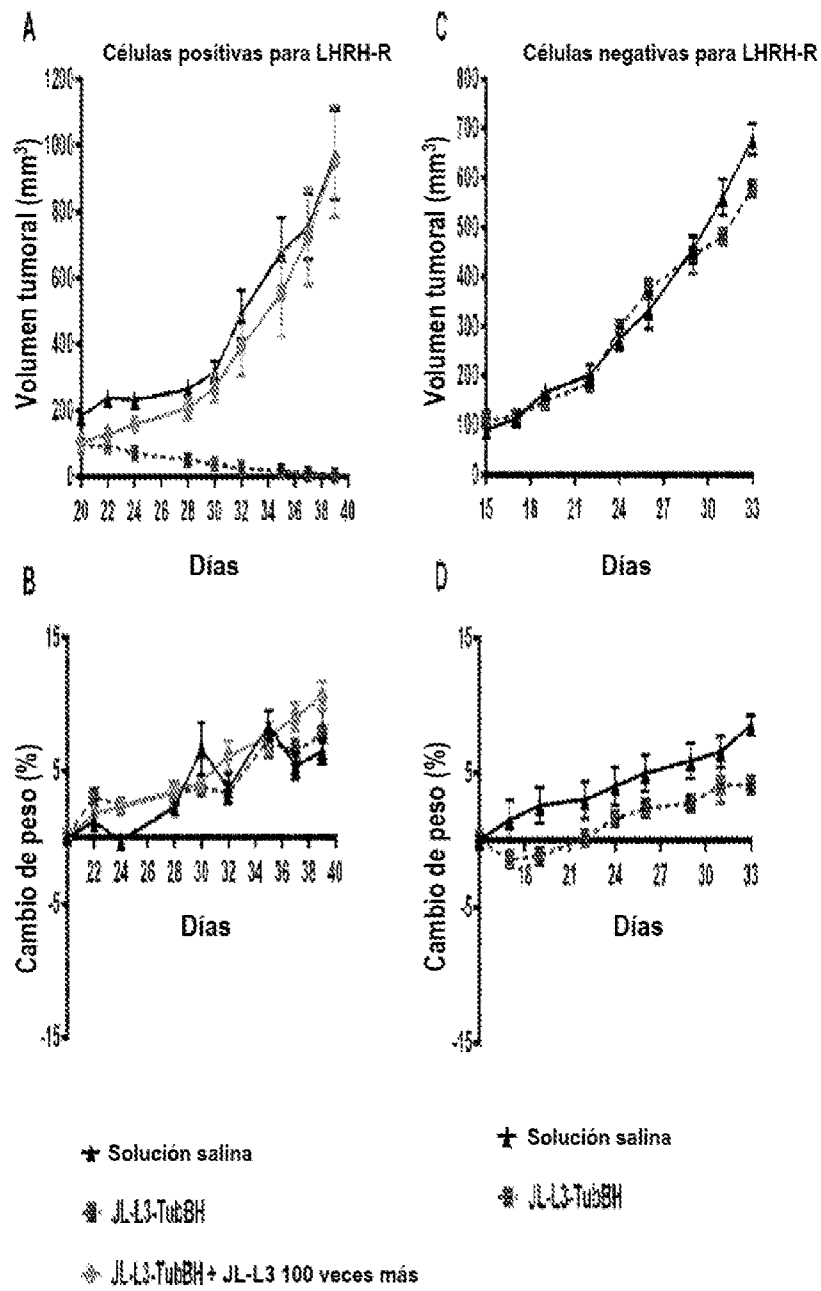


Fig. 22

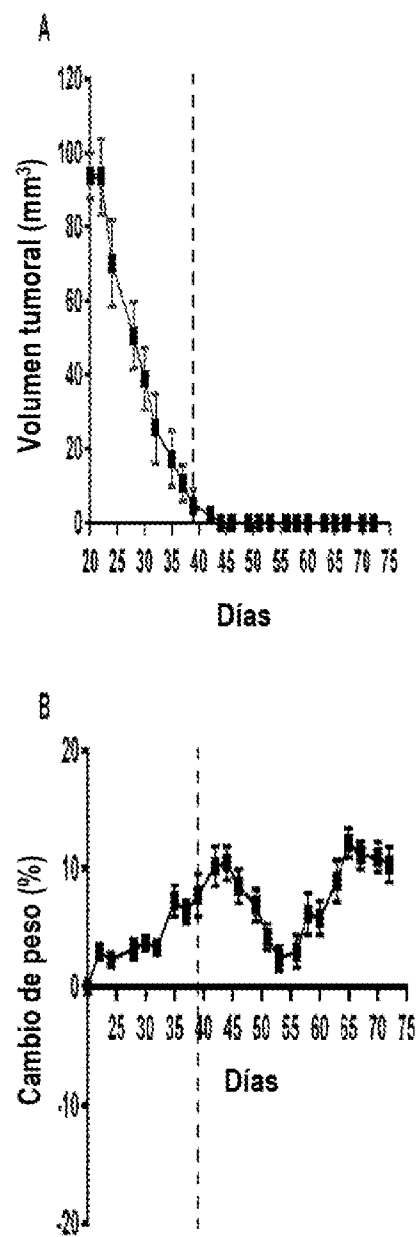


Fig. 23