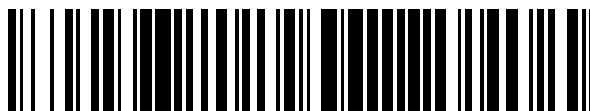


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 937**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008** **E 08804036 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2185204**

54 Título: **Conjugado que comprende un modulador selectivo de los receptores estrogénicos y una toxina inactivadora de ribosomas**

30 Prioridad:

14.09.2007 GB 0718045

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

13.11.2015

73 Titular/es:

**PEPTCELL LIMITED (100.0%)
100 FETTER LANE
LONDON EC4A 1BN, GB**

72 Inventor/es:

**STOLOFF, GREGORY ALAN y
CAPARRÓS-WANDERLEY, WILSON ROMERO**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 550 937 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).

Conjugado que comprende un modulador selectivo de los receptores estrogénicos y una toxina inactivadora de ribosomas**Descripción****CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención se refiere a un tratamiento contra el cáncer que comprende células cancerosas con receptores de estrógeno positivos (ER+) y, en particular, a un tratamiento contra el cáncer de mama. Los inventores proporcionan un conjugado que comprende un componente farmacéutico y un componente compuesto de toxinas. El conjugado tiene una capacidad superior para identificar y destruir las células cancerígenas con ER+.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo, y también es la causa más común de muerte por cáncer. Se cree que existen varios factores que causan cáncer de mama, y uno de estos factores es el incremento de los niveles de estrógeno en la sangre. Se ha investigado mucho en el campo de las familias de los receptores de estrógeno y en las diferencias entre las células cancerosas con receptores de estrógeno y las células con receptores de estrógeno normales. El objetivo de estas investigaciones era descubrir medicamentos que pueden utilizarse para tratar el cáncer de mama suprimiendo la producción de estrógeno en el cuerpo.

[0003] Uno de estos cánceres comprende las células con receptores de estrógeno (células ER+). Estas células tienen un gran número de receptores estrogénicos (o receptores de estrógeno), generalmente, entre 200.000 y 5 millones. Una célula con receptores estrogénicos normal y no cancerosa tiene, habitualmente, entre 20.000 y 80.000 receptores estrogénicos. En presencia del estrógeno, las células cancerosas sufren un incremento de la tasa de división celular y responden incluso a pequeñas cantidades de la hormona debido a su gran cantidad de receptores de estrógeno.

[0004] En 'Surgical Oncology, 12' (2003) 277-287 (Soo Lo, Stephen R.D. Johnston), se analizan terapias sistémicas novedosas contra el cáncer de mama. Estas incluyen terapias endocrinas como antiestrógenos puros y moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (MSRE; o SERM, en inglés), anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores del factor de crecimiento, inhibidores de la transducción de señal de moléculas pequeñas, vacunas y estrategias de inmunoterapia, y terapias antiangiogénesis.

[0005] El tamoxifeno es un medicamento que se ha mostrado eficaz en el tratamiento del cáncer de receptores de estrógeno positivos. El tamoxifeno es un ejemplo de modulador selectivo de los receptores estrogénicos (MSRE) que actúa como un antagonista de las células cancerosas con receptores de estrógeno positivos adhiriéndose a los receptores de estrógeno presentes en la superficie de la célula e impidiendo que el estrógeno se adhiera a las células y, por consiguiente, inhibiendo la división celular. A pesar de ser un antagonista del tejido mamario, actúa como agonista parcial en el endometrio y ha sido relacionado con el cáncer endometrial en algunas mujeres. Por lo tanto, los cambios en el endometrio, incluyendo el cáncer, se encuentran entre los efectos secundarios del tamoxifeno.

[0006] También se ha sugerido que un conjugado de tamoxifeno y una porfirina podría ser eficaz en la terapia fotodinámica de las células cancerosas; cuando se expone a la luz roja, la porfirina muestra actividad fototóxica, y elimina más células con cáncer de mama MCF-7 que la porfirina no conjugada. En 'Bioinorganic & medicinal Chemistry, 10' (2002) 3237-3243 (Swamy, James, Mohr, Hanson and Ray), también se describen conjugados de estradiol y porfirina que, utilizados en terapias fotodinámicas para el cáncer de mama, se fijan de manera selectiva a las células mamarias cancerosas con receptores de estrógeno positivos.

[0007] Otros conjugados que se han investigado para estudiar su eficacia en el tratamiento contra el cáncer incluyen los conjugados de inmunotoxinas. El 'British journal of Haematology', 2000, 110, 351-361 (Bolognesi, Polito et al.) revela la unión entre proteínas inactivadoras de ribosomas como la saporina y anticuerpos monoclonales para el tratamiento del linfoma de Hodgkin. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún producto que haya tenido éxito y haya superado las pruebas con humanos para convertirse en un producto con licencia.

[0008] Mientras que los tratamientos y terapias actuales contra el cáncer y, en particular, contra el cáncer de mama presentes en el mercado ralentizan la división de las células cancerosas, después de unos años las células mutan de tal manera que ya no se ven afectadas por el medicamento y, por lo tanto, dicho medicamento deja de ser útil y los pacientes ya no responden al tratamiento.

[0009] Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar un nuevo tratamiento para los cánceres ER+, incluyendo, en particular, los cánceres de mama de este tipo; esto resolverá los problemas previamente mencionados destruyendo las células cancerosas ER+ en lugar de reducir simplemente la tasa de división celular de estas células cancerosas tal y como hacen otros tratamientos y MSRE.

[0010] Las cuestiones y las realizaciones de la presente invención que se describen más abajo resuelven los problemas que se han mencionado previamente.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto que comprende:

- (a) un primer componente capaz de adherirse a los receptores de las células ER+; y
- (b) un segundo componente;

donde el segundo componente es una toxina inactivadora de ribosomas y está conjugada con el primer componente.

[0012] El primer componente es capaz de adherirse o unirse a las células que tienen receptores de estrógeno -las llamadas células ER+ o, en otras palabras, es capaz de unirse a los receptores de células ER+ o receptores de estrógeno celulares. Tal y como se ha mencionado más arriba, en este contexto, los receptores de células ER+ son receptores celulares de estrógeno positivos (ER+). Estos pueden estar presentes en muchos tipos de células, y la presente invención abarca los componentes capaces de adherirse a todos los receptores ER+, independientemente del tipo de célula. No obstante, generalmente las células que son de interés para la presente invención son células cancerosas, que normalmente tienen un gran número de receptores estrogénicos, habitualmente, entre 200.000 y 5 millones. Todos los tipos de células mamarias cancerosas son de especial interés para la presente invención. Por el contrario, las células normales no cancerosas con receptores de estrógeno tienen, habitualmente, entre 20.000 y 80.000 receptores estrogénicos.

[0013] El primer componente es un modulador selectivo de los receptores estrogénicos (MSRE), como un compuesto de raloxifeno.

[0014] Generalmente, en lo que atañe a la presente invención, la toxina inactivadora de ribosomas es una proteína (una toxina proteica inhibidora de ribosomas se denomina toxina RIP o 'RIP toxin', en inglés) y, preferiblemente, la RIP es una RIP de tipo I. Normalmente, estas proteínas actúan bloqueando de manera irreversible la síntesis de proteínas y causando la muerte celular. No hay limitaciones específicas para determinar cuál es la toxina elegida, siempre y cuando se ajuste a los criterios previamente mencionados. En una realización preferente, la toxina es una saporina.

[0015] En una realización preferente, el compuesto tiene una relación estequiométrica entre el primer componente y el segundo componente de va desde 0,5:1 hasta N:1, donde N es el número total de sitios de unión del primer componente con el segundo componente. No hay limitaciones específicas para los sitios de unión, excepto que deben ser capaces de unir el primer componente al segundo componente. Habitualmente, pero no de manera exclusiva, el sitio de unión es una tirosina o una lisina. En la saporina hay hasta 14 sitios de unión de tirosina y hasta 23 sitios de unión de lisina, siendo cada uno de ellos capaz de actuar de manera independiente como sitio de unión para el primer componente (esto es, N=14, N=23 o N=37, dependiendo de si sólo se usan los puntos de unión de la tirosina, sólo los de la lisina, o se usan los de la tirosina y la lisina). Así, los rangos preferidos van de 0,5:1 hasta 37:1, preferentemente, de 0,5:1 hasta 23:1, y, más preferentemente, de 0,5:1 hasta 14:1. No obstante, dependiendo de qué puntos de unión se usen, podrá emplearse cualquier proporción o relación que se ajuste a estos rangos.

[0016] En otras realizaciones especialmente preferentes, la relación estequiométrica del primer componente con el segundo componente va de 0,5:1 a 8:1 (preferentemente, de 0,5:1 a menos de 8:1), y, más preferentemente, de 0,5:1 a 2,5:1. También se prefieren las estequiometrías siguientes: de 0,5:1 a 7:1, 0,5:1 a 6:1, 0,5:1 a 5:1, 0,5:1 a 4:1, 0,5:1 a 3:1 y 0,5:1 a 2:1.

[0017] En este sentido, la relación estequiométrica puede hacer referencia tanto a la estequiometría habitual como a la estequiometría molecular. Por ejemplo, una mezcla que comprenda un conjugado con una relación estequiométrica molecular de 1:1 (esto es, una molécula del primer componente conjugada con cada molécula del segundo componente) y un conjugado con una estequiometría molecular de 3:1 (esto es, tres moléculas del primer componente conjugadas con cada molécula del segundo componente), ambos en las mismas proporciones, tendrá una estequiometría media de 2:1. De este modo, son posibles las estequiometrías no enteras.

[0018] La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos que se han descrito más arriba.

[0019] En otro de sus aspectos, esta invención proporciona cualquiera de los compuestos y composiciones (tal y como se han descrito más arriba) para que sean usados en medicina.

[0020] Un aspecto adicional de la presente invención proporciona cualquiera de los compuestos y composiciones previamente mencionados para que se usen en el tratamiento de un cáncer relacionado con células ER+. No hay limitaciones específicas en cuanto al tipo de cáncer con células ER+, pero se prefiere particularmente que el cáncer sea un cáncer de mama. El medicamento está indicado para tratar a cualquier mamífero y, de manera particular, se

prefieren los sujetos humanos. No hay limitaciones específicas en cuanto al método de administración, pero es preferible que el medicamento sea apto para la inyección y la infusión (intravenosa o de otro tipo) o para la administración oral a un sujeto.

[0021] No hay limitaciones específicas en cuanto a la dosis que se emplee con el medicamento, siempre y cuando se administre una dosis suficiente que cumpla con los requerimientos en cuanto a eficacia y toxicidad. En una realización preferente de la presente invención, el medicamento es apto para ser inyectado en el sujeto de manera que se obtengan unas concentraciones máximas del conjugado en la sangre equivalentes a entre el 1% y el 500% de la concentración clínica máxima en sangre que tiene el primer componente cuando se utiliza en una forma no conjugada.

[0022] En una realización preferente adicional de la presente invención, el medicamento es apto para ser inyectado en el sujeto de manera que se obtenga entre el 80% y el 140% de la concentración clínica máxima en sangre del primer componente cuando se utiliza en una forma no conjugada.

[0023] En este sentido, las concentraciones en sangre de raloxifeno que se pretenden conseguir se basan en la concentración terapéutica máxima de raloxifeno en sangre para un humano estándar (esto es, 0,5 ng/ml).

[0024] Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para fabricar cualquiera de los compuestos tal y como se ha descrito más arriba, haciendo reaccionar al primer componente con el segundo componente para que se conjugue el primer componente con el segundo componente.

[0025] Adicionalmente, la presente invención proporciona un medicamento para su uso en un método de tratamiento para un cáncer con células ER+ y, en particular, un cáncer de mama. Este método consiste en administrar un medicamento a un sujeto y el medicamento, a su vez, comprende cualquiera de los compuestos o composiciones definidos previamente. Los autores de la presente invención han descubierto de manera sorprendente que los compuestos y composiciones conjugados de acuerdo con la presente invención proporcionan un tratamiento eficaz contra las células cancerosas ER+. El uso de este tratamiento se tradujo en una reducción inicial significativa del volumen diario de tumores y también en una reducción mayor y sostenida de la tasa de crecimiento de tumores, sin tener un efecto significativo sobre las células ER+ no cancerosas.

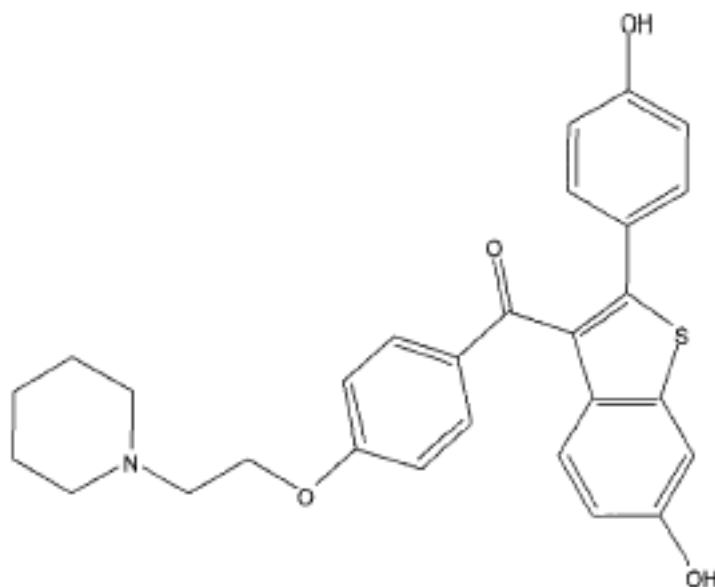
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0026] La presente invención proporciona un compuesto que comprende un primer componente, donde el primer componente es un modulador selectivo de los receptores estrogénicos (MSRE) y un segundo componente, donde el segundo componente es una toxina inactivadora de ribosomas, habitualmente una clase de toxina RIP de tipo I, y donde el segundo componente está conjugado al primer componente.

[0027] El primer componente de la presente invención es capaz de adherirse o unirse a los receptores de las células ER+. Se ha descubierto que cualquier compuesto de moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (MSRE) es especialmente útil. El tipo de MSRE puede incluir cualquiera de los siguientes: fulvestrant, tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno, droloxifeno, idoxifeno y lasofoxifeno. De manera particular, un compuesto de raloxifeno es especialmente útil.

[0028] El segundo componente es una toxina inactivadora de ribosomas. Tal y como se ha explicado, preferiblemente es una proteína (una toxina RIP) y, más preferentemente, una RIP de tipo I. Se prefiere, particularmente, que la toxina no pueda penetrar en las células por sí misma y que actúe solamente en los mecanismos internos de las células. El raloxifeno es un MSRE (modulador selectivo de los receptores estrogénicos) de 510 Da que se usa en la prevención de la osteoporosis en las mujeres posmenopáusicas. Un reciente ensayo clínico (Vogel VG; Costantino JP; et. al.; para la National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP). 'Effects of Tamoxifen vs Raloxifene on the Risk of Developing Invasive Breast Cancer and Other Disease Outcomes: The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene' (STAR) P-2 Trial. JAMA. 2006;295:2727-2741) ha demostrado que el raloxifeno es tan efectivo como el tamoxifeno a la hora de reducir la incidencia del cáncer de mama de receptores de estrógeno positivos. Sin embargo, los pacientes que tomaron raloxifeno a diario tuvieron un 36% menos de cánceres de útero y un 29% menos de coágulos sanguíneos que las mujeres que tomaron tamoxifeno a diario. Los cánceres de útero y, especialmente, los cánceres de endometrio, son un importante efecto secundario del tamoxifeno.

[0029] Un compuesto de raloxifeno puede adoptar la siguiente estructura:



[0030] En la estructura de más arriba, uno o más de los hidrógenos unidos a los carbonos pueden sustituirse por sustituyentes.

[0031] Los sustituyentes para el raloxifeno pueden comprender cualquier grupo orgánico y/o uno o más átomos de cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, como un átomo de B, Si, N, P, O o S o un átomo halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I). Cuando el sustituyente comprende un grupo orgánico, el grupo orgánico comprende de manera preferente un grupo hidrocarburo. El grupo hidrocarburo puede contener una cadena lineal, una cadena ramificada o un compuesto cíclico. De manera independiente, el grupo hidrocarburo puede contener un grupo alifático o un grupo aromático. También de manera independiente, el grupo hidrocarburo puede contener un grupo saturado o insaturado.

[0032] Cuando el hidrocarburo contiene un grupo insaturado, puede adoptar una o más de las características de los alquenos y/o una o más de las características de los alquinos. Cuando el hidrocarburo contiene un grupo con una cadena lineal o ramificada, puede comprender uno o más grupos alquilo primarios, secundarios y/o terciarios. Cuando el hidrocarburo contiene un grupo cíclico, puede comprender un anillo aromático, un anillo alifático, un grupo heterocíclico y/o derivados fusionados anulares de estos grupos. Así, el grupo cíclico puede comprender un grupo de benceno, naftaleno, antraceno, indeno, fluoreno, piridina, quinolina, tiofeno, benzotiofeno, furano, benzofurano, pirrol, indol, imidazol, tiazol y/u oxazol, así como regioisómeros de estos grupos.

[0033] El grupo hidrocarburo comprende preferiblemente entre 1 y 40 átomos de C. De este modo, el grupo hidrocarburo puede ser un hidrocarburo pequeño (1-6 átomos de C) o un hidrocarburo mayor (7 átomos de C o más, por ejemplo, entre 7 y 40 átomos de C). El anillo del grupo cíclico contiene, preferentemente, entre 3 y 10 átomos (por ejemplo, 3, 4, 5, 6 ó 7 átomos).

[0034] Los grupos que contienen heteroátomos como los arriba descritos, así como cualquiera de los otros grupos arriba explicados, pueden comprender uno o más heteroátomos pertenecientes a cualquiera de los grupos IIIA, IVA, VA, VIA o VIIA de la Tabla Periódica, como átomos de B, Si, N, P, O o S o un átomo halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I). Así, el sustituyente puede comprender uno o más de cualquiera de los grupos funcionales habituales en química orgánica, como hidroxilos, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, aldehídos, cetonas, aminas, amidas, iminas, tioles, tioéteres, sulfatos, ácidos sulfónicos, fosfatos, etc. El sustituyente también puede comprender derivados de estos grupos, como anhídridos de ácido carboxílico y haluros de ácido carboxílico.

[0035] Además, cualquier sustituyente puede comprender una combinación de dos o más de los sustituyentes y/o grupos funcionales arriba descritos.

[0036] Cuando el segundo componente de la presente invención es una toxina RIP de tipo I, puede ser cualquier saporina, momordina (MOM), proteína antiviral de las semillas de *Phytolacca americana* (PAP-S), bouganina y gelonina; y de éstas, en particular, la saporina es útil como la toxina que forma parte del compuesto y de la composición farmacéutica de la presente invención.

[0037] La saporina es una proteína inactivadora de ribosomas (RIP) de tipo I de 30 kDa que se obtiene de las semillas de la planta *Saponaria* (*Saponaria officinalis*). La actividad de la N-glicosidasa de la saporina depurina un nucleótido específico del ARN ribosómico 28S, bloqueando de manera irreversible la síntesis proteínica y causando la muerte celular. La saporina también se puede obtener por recombinación, y no sólo a partir de semillas.

[0038] Una forma preferida de saporina es aquella conocida como SO-6. Esta forma de saporina es inusual porque es altamente estable frente a los agentes desnaturalizantes, las proteasas y el calor. Además, a diferencia de las RIP de tipo II (por ejemplo, la ricina), la saporina carece de un mecanismo propio de unión celular e internalización y, por tanto, se considera segura bajo condiciones normales (Stirpe F., Gasper-Campani A., Barbieri L., Falasca A., Abbondanza A., Stevens W.A. (1983); 'Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort) of *Agrostemma githago* L. (corncockle) and of *Asparagus officinalis* (asparagus) and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree)'. *Biochem J* 216: 617-625).

[0039] Se ha descubierto que una conjugación covalente resulta eficaz usando un enlazante químico como bis-diazo-(o-tolidina) [BDT]. De nuevo, no hay limitaciones específicas para el uso del enlazante y para el compuesto utilizado como enlazante, pero se ha demostrado que los ejemplos particulares explicados más arriba funcionan de manera eficaz.

[0040] En los compuestos obtenidos de acuerdo con la presente invención, la relación estequiométrica del primer componente con el segundo componente puede estar en un rango que va de 0,5:1 a N:1, donde N es el número total de sitios de unión del primer componente en el segundo componente. De entre los conjugados con relaciones estequiométricas del primer componente en el segundo componente en un rango de 0,5:1 a 14:1, los conjugados en un rango de 0,5:1 a 8:1 y, preferiblemente, de 0,5:1 a 2,5:1 pueden ser eficaces en el tratamiento de células cancerosas ER+. Los autores de la presente invención han descubierto de manera sorprendente que una relación de aproximadamente 2:1 de raloxifeno:saporina produce el conjugado más eficaz para el tratamiento de células mamarias cancerosas. Su uso se tradujo en una reducción inicial significativa del volumen diario de tumores y también en una reducción mayor y sostenida de la tasa de crecimiento de tumores. No obstante, cualquier conjugado de la presente invención en un rango de 0,5:1 a menos de 8:1 puede ser igualmente efectivo.

[0041] Una composición farmacéutica que comprenda cualquiera de los compuestos de la presente invención también puede comprender un portador, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0042] Los compuestos y composiciones obtenidos de acuerdo con la presente invención se usan habitualmente para la fabricación de un medicamento utilizado en el tratamiento de cánceres asociados a células ER+, y son particularmente útiles en los tratamientos contra el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el cáncer cervical, entre otros cánceres ER+.

[0043] Los compuestos y composiciones de la presente invención son aptos para su uso en todos los mamíferos y, particularmente, en humanos.

[0044] Adicionalmente, se podrán usar de manera que el medicamento sea apto para su inyección o infusión -y sin que haya limitaciones específicas-, particularmente, por vía intravenosa, subcutánea o por cualquier otro medio, incluyendo la administración oral.

[0045] Adicionalmente, se podrán usar para ser inyectados en un sujeto para obtener una concentración máxima en sangre de entre el 1% y el 500% de la concentración clínica máxima en sangre que tiene el primer componente cuando se utiliza en una forma no conjugada. Particularmente, podrán usarse de manera adicional para inyectarse y alcanzar entre el 1% y el 400% de la concentración clínica máxima en sangre o, adicionalmente, entre el 1% y el 300% o, más particularmente, para alcanzar entre el 1% y el 200% y, preferiblemente, entre el 80% y el 140%. Los autores de la presente invención descubrieron de manera sorprendente que el tratamiento para obtener un conjugado de entre el 80% y el 140% con una relación 2:1 raloxifeno:saporina acarreó una reducción inicial significativa del volumen diario de tumores -en comparación con los resultados de control- y también una reducción mayor y sostenida de la tasa de crecimiento de tumores, sin tener un efecto significativo sobre las células ER+ no cancerosas.

[0046] A diferencia de los actuales medicamentos contra el cáncer, que actúan como antagonistas competitivos del estrógeno (esto es, reducen la tasa de división celular), el compuesto, la composición farmacéutica y el tratamiento de la presente invención tienen un efecto letal sobre las células que poseen un gran número de receptores ER (es decir, las células cancerosas), pero no sobre otras células ER+. La destrucción de las células cancerosas causada por un tratamiento a corto plazo reduce las posibilidades de que haya alteraciones fenotípicas; estas alteraciones se observan habitualmente en las células cancerosas que han sufrido una exposición prolongada a antagonistas competitivos, lo que conlleva que las células diana provoquen una pérdida de sensibilidad en el competidor. Este producto se vería afectado negativamente si la célula cancerosa mutara de ER+ a ER-. Este producto tiene dos ventajas sobre el Herceptin (el anticuerpo monoclonal humanizado que actúa sobre los receptores HER2/neu y se utiliza en el tratamiento contra el cáncer de mama). En primer lugar, localiza las células cancerosas ER+ (ya sean Her2/neu positivas o no), mientras que el Herceptin actúa principalmente contra las células cancerosas Her2/neu positivas; y, en segundo lugar, destruye las células cancerosas en vez de ralentizar simplemente su replicación. El producto de la presente invención no tiene las limitaciones asociadas a la terapia fotodinámica, ya que puede localizar células cancerosas y actuar contra ellas incluso en el caso de que no se pueda aplicar ninguna fuente de luz sobre las células cancerosas en cuestión. Este producto también es superior a las inmunotoxinas (es decir, los

anticuerpos monoclonales unidos a una toxina), ya que debería tener un riesgo menor de síndrome de fuga capilar y nefrotoxicidad debido a la formación de complejos inmunes.

[0047] Además, independientemente de si el MSRE (portador) y la RIP de tipo I (toxina) están separados debido a la acción de las proteasas intracelulares sobre el enlazante después de que el conjugado haya entrado en la célula diana, la eficacia del producto no se vería alterada ya que sería independiente de la unión del MSRE con su receptor o de cualquier mecanismo celular que se active como consecuencia de dicha unión. Es decir, una vez dentro de la célula, la RIP de tipo I tiene un efecto directo, negativo e irreversible sobre los ribosomas y, por lo tanto, sobre la traducción de todos los ARNm (ARN mensajeros), ya sea efectuada por los genes constitutivos, inducida como resultado de señales de estímulo provenientes de la unión y la activación de cualquier otro receptor celular (por ejemplo, como el causado por la unión del portador MSRE con un receptor celular), o por cualquier otro mecanismo ambiental o interno y/o estímulo.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0048] A continuación, la presente invención se describirá con más detalle únicamente mediante ejemplos, haciendo referencia a la exposición siguiente y a los dibujos adjuntos, donde:

La Figura 1 muestra la supervivencia de monocapas de células MCF-7, HCC-1143 y OVCAR-3 expuestas a concentraciones decrecientes de diferentes conjugados de saporina:raloxifeno (S:R). La supervivencia celular (%) de cada línea celular se calcula de acuerdo con un ensayo estándar de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), donde la liberación mínima (0% de supervivencia) corresponde a las células tratadas con 50 µg/ml de Mitomicina C y la liberación máxima (100% de supervivencia) corresponde a las células tratadas sólo con el medio completo.

La Figura 2 muestra la supervivencia de monocapas de células MCF-7, HCC-1143 y OVCAR-3 expuestas a un conjugado 2:1 raloxifeno:saporina (conjugado S:R 1:2) de 500 nM o a las concentraciones molares equivalentes de saporina (500 nM), raloxifeno (1000 nM) y de una mezcla (esto es, no conjugada) de saporina (500 nM) y raloxifeno (1000nM). La supervivencia celular (%) de cada línea celular se calcula de acuerdo con un ensayo estándar de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), donde la liberación mínima (0% de supervivencia) corresponde a las células tratadas con 50 µg/ml de Mitomicina C y la liberación máxima (100% de supervivencia) corresponde a las células tratadas sólo con el medio completo.

La Figura 3 muestra el perfil de crecimiento de tumores de MCF-7 en ratones hembra desnudos que siguieron un tratamiento con tampón fosfato salino (PBS; Phosphate buffered saline, en inglés), 0,4 ng/ml de raloxifeno ó 0,4 nM de un conjugado 2:1 raloxifeno:saporina (S:R 1:2). Los animales recibieron un tratamiento intravenoso a través de la ruta retro-orbital los días 36 y 43 después de ser expuestos.

La Figura 4 muestra el porcentaje de cambios en el volumen de tumores con un tratamiento que utiliza el conjugado (en comparación con un producto de control no conjugado).

La Figura 5 muestra el porcentaje de cambios en el peso corporal con un tratamiento que utiliza el conjugado (en comparación con un producto de control no conjugado).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Conjugación de raloxifeno con saporina

[0049] El raloxifeno (Sigma) se conjugó a la saporina (Sigma) utilizando bis-diazo-(o-tolidina) [BDT] como enlazante (este enlazante es útil para unir o enlazar mediante tirosina). El enlazante es bastante estable en una solución ácida, pero reacciona con extrema rapidez con tirosina y con otros fenoles aromáticos cuando el pH sube a 7. Por esta razón, es difícil controlar la reacción. Si no se controla de manera adecuada, el enlazante usará la saporina para crear reticulaciones o enlaces cruzados atravesando las 14 tirosinas presentes en su secuencia y destruirá su integridad. Por lo tanto, las condiciones usadas son críticas.

[0050] Los conjugados se prepararon con unas relaciones de raloxifeno:saporina de 14:1, 8(aproximadamente):1 y 2:1.

[0051] Más abajo se proporciona un método para elaborar una conjugación 2:1 (raloxifeno:saporina):

Para realizar la conjugación se utilizó un excedente molar de BDT para tirosina (en saporina) 10 veces más alto y se permitió que la reacción tuviera lugar durante un periodo de 30 segundos a más de 50 segundos y con una temperatura de -20° C. Después de subir el pH de 2 a 5 añadiendo el volumen adecuado de una solución molar de hidróxido de sodio en agua (M.NaOHaq), la reacción se detuvo añadiendo ácido clorhídrico molar (M.HCl). El análisis espectroscópico con UV reveló que, de media, dos moléculas de BDT reaccionaban con cada molécula de saporina, siendo el tiempo de reacción de 30 segundos. Períodos de incubación más elevados arrojaron

medias de entre 8 y 14 moléculas de BDT reaccionando con cada molécula de saporina. El excedente de BDT se utilizó para aumentar las probabilidades de que cada una de estas moléculas de BDT sólo reaccionara con una tirosina. Esto significa que el segundo grupo diazo en cada una de estas dos moléculas de BDT se quedó sin reaccionar y, por lo tanto, siguió estando disponible para reaccionar con el raloxifeno, que tiene tres grupos fenólicos en su estructura.

[0052] Después de efectuar una filtración de gel en M.HCl con la mezcla para retirar el excedente de BDT, se hizo reaccionar a los conjugados de BDT-saporina con una gran cantidad excedente de raloxifeno en un 50% de metanol aumentando el pH a 7. La solución se reacidificó inmediatamente porque el raloxifeno es estable en soluciones ácidas, pero no en soluciones alcalinas. Al usar grandes cantidades excedentes de raloxifeno se aseguró que se uniría a la saporina por medio de la BDT a través de uno solo de sus grupos fenólicos. De este modo, se modificaría químicamente lo mínimo posible y, por consiguiente, conservaría su integridad en la medida de lo posible.

[0053] La reacción con raloxifeno produjo una solución marrón y este color se eliminó extrayendo la solución con cloroformo. La capa acuosa y pálida de color pajizo se evaporó hasta tener un volumen pequeño a 40° C y al vacío, y se centrifugó a 13.000 r.p.m. para eliminar la materia sólida. La solución pálida y amarillenta que se obtuvo se depuró mediante una filtración de gel en M.HCl para producir una solución incolora del conjugado de raloxifeno-BDT-saporina.

Ejemplo 2 - Líneas celulares

[0054] La línea de células MCF-7 (ECACC, catálogo nº. 86012803) se aisló a partir de un adenocarcinoma de mama de una mujer de 69 años y expresa el receptor de estrógeno. La línea celular se conservó en el Medio Esencial Mínimo (MEM) y se complementó con 2 mM de L-Gln (Sigma), un 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma), 100 UI de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Sigma) y, como medio completo, un 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma).

[0055] La línea de células HCC-1143 (ATTC, catálogo nº. CRL-2321) se aisló a partir de un carcinoma ductal primario de una mujer de 52 años y no expresa el receptor de estrógeno. La línea celular se conservó en un medio de cultivo celular RPMI-1640 (Sigma) y se complementó con 2 mM de L-Gln (Sigma), 10 mM de HEPES (Sigma), 1 mM de Na-Pyr (Sigma), 100 UI de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Sigma) y, como medio completo, un 10% de SFB (Sigma).

[0056] Por último, la línea de células NIH:OVCAR-3 (ATTC, catálogo nº. HTB-161) se aisló a partir de un adenocarcinoma de ovario de una mujer de 60 años y expresa el receptor de estrógeno. La línea celular se conservó en un medio de cultivo celular RPMI-1640 (Sigma) y se complementó con 2 mM de L-Gln (Sigma), 10 mM de HEPES (Sigma), 1 mM de Na-Pyr (Sigma), 0,01 mg/ml de insulina bovina (Sigma), 100 UI de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Sigma) y, como medio completo, un 20% de SFB (Sigma).

Ejemplo 3 - Ensayo clonogénico

[0057] Se cosecharon cultivos de MCF-7, HCC-1143 y OVCAR-3 con una confluencia aproximada del 80% usando una técnica de tripsinización y, después de lavarlos con agua en un medio sin suero, se distribuyeron en placas microtituladoras con 96 pozos de fondo plano (Nunc) en 200 µl de medio completo, de manera que había 5×10^3 células en cada pozo.

[0058] Tras 48 horas de incubación a 37° C, se extrajo el medio y se sustituyó con diversas disoluciones de prueba (100 µl/pozo; conjugados de raloxifeno:saporina en PBS) o sustancias de control (saporina, raloxifeno, PBS (Sigma) y, por último, Mitomicina C (Sigma) como control positivo) en un medio completo y por cuadruplicado.

[0059] 18 horas después de la incubación a 37° C, los compuestos de prueba se retiraron y se añadieron 200 µl de medio completo a cada pozo.

[0060] 96 horas después de la incubación a 37° C, se retiró el medio y se añadió a cada pozo 100 µl de Triton X-100 (0,9%) (Sigma) en PBS. 2 horas después de la incubación a 37° C, 50 µl de la solución PBS-Triton se transfirieron de todos los pozos a una nueva placa microtituladora con 96 pozos de fondo plano.

[0061] El reactivo de detección del Kit de Ensayo de Citotoxicidad No Radiactivo CytoTox 96® (Promega) se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se añadió a cada pozo 50 µl de reactivo de detección. Después de 30 minutos de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, se detuvo la reacción añadiendo 50 µl de una solución de paro a cada pozo y se estableció una absorbancia de 490 nm para cada pozo.

Ejemplo 4 - Actividad antitumoral in vivo

[0062] Se expuso a 30 ratones hembra desnudos (nu/nu) de 6-8 semanas implantándoles subcutáneamente 2×10^7 células MCF-7 mezcladas con Matrigel (Becton Dickinson) (200 µl de volumen total). La pérdida de peso y el

crecimiento de tumores (calculados tomando dos mediciones perpendiculares y aplicando la fórmula $[\pi*((\text{min medición})/2)^2*(\text{medición máxima})]$) se monitorizaron cada día hasta la conclusión del estudio.

[0063] Cuando los tumores presentes alcanzaron un volumen de 0,3 cm³ (día 36 después de la exposición) los animales se separaron en grupos de 3 y a cada grupo se le administró una dosis intravenosa (a través de la ruta retro-orbital) con uno de los siguientes compuestos:

- 100 µl de un conjugado 2:1 de raloxifeno:saporina (S:R 1:2) en PBS para obtener una concentración máxima en sangre del conjugado R:S 2:1 de 0,4, 0,2 y 0,1 nM, que son equivalentes, respectivamente, a 0,4, 0,2 y 0,1 ng/ml de Raloxifeno (esto es, tres grupos: A, B y C, respectivamente).
- De nuevo, 100 µl de raloxifeno en PBS para obtener una concentración máxima en sangre del conjugado de 0,4, 0,2 y 0,1 ng/ml de raloxifeno (esto es, tres grupos: D, E y F, respectivamente).
- 100 µl de PBS (es decir, un grupo: G).

[0064] Las concentraciones de raloxifeno en sangre que se persiguen se basan en la concentración terapéutica máxima de raloxifeno en sangre para un humano estándar (esto es, 0,5 ng/ml). Las dosis individuales para ratones requeridas para alcanzar esta concentración de raloxifeno en sangre, preparadas como un conjugado o como un producto puro, se calcularon multiplicando el peso individual de cada ratón (g) por 0,08 (en ml el volumen de sangre de un ratón es, de media, el 8% de su peso) y por la concentración de raloxifeno en sangre deseada (esto es, 0,4, 0,2 y 0,1 ng/ml).

[0065] Siete días después de la primera dosis (día 43 después de la exposición), los animales recibieron una segunda dosis de conjugado, raloxifeno puro o PBS con el objetivo de alcanzar las mismas concentraciones finales de raloxifeno en sangre (esto es, 0,4, 0,2 y 0,1 ng/ml).

Análisis estadístico

[0066] Las diferencias estadísticas se calcularon usando pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

[0067] El objetivo del estudio era establecer si un conjugado de saporina y raloxifeno puede matar de manera selectiva células cancerosas con receptores de estrógeno (ER) positivos sin matar células ER positivas del tracto genital femenino u otras células no ER positivas. Con este objetivo, se conjugó saporina con raloxifeno con relaciones molares (R:S) de 14:1, 8:1 y 2:1 y se comprobó el efecto que las dosis cada vez más grandes de estos conjugados tenían sobre las monocapas de células MCF-7 (línea de células mamarias cancerosas ER positivas), HCC-1143 (línea de células mamarias cancerosas ER negativas) y OVCAR-3 (línea de células mamarias cancerosas ER positivas).

[0068] Como muestra la Figura 1, el conjugado de raloxifeno:saporina 14:1 (S:R 1:14) tuvo un efecto limitado en todas las líneas celulares y, desde luego, no tuvo un efecto letal selectivo contra las células MCF-7 en comparación con las células HCC-1143 u OVCAR-3. Por el contrario, se demostró que el conjugado de raloxifeno:saporina 8:1 (S:R 1:8) es letal para todas las líneas celulares si las concentraciones del conjugado son de 500 nM o superiores. Sólo con una concentración de 250 nM se puede observar un ligero aumento del efecto letal selectivo contra las células MCF-7 ($33,6 \pm 2\%$ de supervivencia de MCF-7 vs $70,8 \pm 5\%$ de HCC-1143 y $61,2 \pm 5,6\%$ de supervivencia de OVCAR-3).

[0069] De manera similar al conjugado de raloxifeno:saporina 8:1 (S:R 1:8), el conjugado de raloxifeno:saporina 2:1 (S:R 1:2) mató todas las células (independientemente de su estatus ER) utilizando la concentración de conjugado más elevada que se probó. No obstante, con dosis más pequeñas el conjugado de raloxifeno:saporina 2:1 tuvo el efecto selectivo más significativo de los tres conjugados que se probaron. Con una concentración del conjugado de 500nM, el conjugado de raloxifeno:saporina 2:1 mató a la mayoría de células MCF-7 ($4,9 \pm 4,3\%$ de supervivencia), mientras que sólo tuvo un efecto limitado sobre las HCC-1143 ($62,8 \pm 10,7\%$ de supervivencia) y las OVCAR-3 ($65,2 \pm 3,5\%$ de supervivencia).

[0070] A la vista de estos resultados, el conjugado de raloxifeno:saporina 2:1 se seleccionó para un posterior análisis *in vitro* más detallado. Para ello, las monocapas de células MCF-7, HCC-1143 y OVCAR-3 se trataron con raloxifeno:saporina 2:1 a 500 nM y también con las concentraciones molares equivalentes de saporina (500nM), raloxifeno (1000 nM) y de una mezcla (en este caso, no conjugada) de saporina (500nM) y raloxifeno (1000 nM).

[0071] Como se muestra en la Figura 2, que representa la media de dos experimentos independientes en los que el raloxifeno tuvo un efecto selectivo significativo ($p < 0,05$) contra la línea de células mamarias cancerosas ER positivas MCF-7, pero no contra la línea de células HCC-1143 ER negativas o la línea de células de ovario ER positivas OVCAR-3. De manera similar, la mezcla de raloxifeno y saporina tuvo un efecto selectivo sobre las células MCF-7 que puede atribuirse probablemente a la actividad del raloxifeno, ya que no se pudo atribuir ningún efecto letal

significativo ($p > 0.05$) a la saporina por sí sola. La conjugación de raloxifeno y saporina con una relación molar de 2:1, comparada con una simple mezcla de ambos compuestos, provocó un aumento significativo ($p, 0.05$) del efecto letal de los compuestos contra MCF-7 ($16,0 \pm 6.3\%$ vs $51,6 \pm 3.2\%$ de supervivencia de MCF-7), pero sólo provocó un incremento limitado del efecto letal contra las células HCC-1143 ($72,4 \pm 5,7\%$ vs $84,3 \pm 8,5\%$ de supervivencia de HCC-1143) y las células OVCAR-3 ($77,7 \pm 4,9\%$ vs $104,4 \pm 2,5\%$ de supervivencia de OVCAR-3).

[0072] Para probar la eficacia del conjugado de raloxifeno:saporina 2:1 (S:R 1:2) a la hora de controlar el crecimiento tumoral in vivo, se expuso subcutáneamente a ratones hembra desnudos (nu/nu) con células MCF-7. Una vez que los tumores se habían asentado (día 36), se trató a los ratones con inyecciones de bolo intravenosas de raloxifeno:saporina 2:1 (S:R 1:2) a través de la ruta retro-orbital con el objetivo de alcanzar concentraciones máximas de raloxifeno:saporina 2:1 (S:R 1:2) en sangre de 0,4, 0,2 y 0,1 nM. Estas concentraciones son equivalentes a las necesarias para obtener concentraciones máximas de raloxifeno en sangre de 0,4, 0,2 y 0,1 ng/ml, lo que constituye, respectivamente, el 80%, el 40% y el 20% de la concentración clínica máxima de raloxifeno en sangre que se busca conseguir en humanos. Los animales de control recibieron PBS o las mismas dosis de raloxifeno por la misma vía. En el día 43, los animales recibieron una segunda dosis de raloxifeno:saporina 2:1 (S:R 1:2), PBS o raloxifeno.

[0073] Debido a la sensibilidad natural de las células MCF-7 a la producción de estrógeno, la variación en el volumen diario de tumores de los ratones desnudos usados como modelo sigue un patrón sinusoidal con un periodo de aproximadamente 4-5 días (ver Figura 3). La duración de este periodo es correlativa con la duración del ciclo estral de los ratones (esto es, 4-5 días). En consecuencia, y para facilitar el análisis experimental, la Figura 3 representa las variaciones en el volumen de tumores de cada grupo experimental, bien como los cambios diarios o bien como medias móviles (esto es, una línea de tendencia) en periodos superpuestos de 5 días (la superposición es de 4 días por punto).

[0074] El grupo tratado con PBS siguió el patrón sinusoidal de crecimiento tumoral descrito más arriba. Este patrón se caracteriza por su tendencia natural a incrementar el volumen máximo de tumores obtenido en cada ciclo, produciendo finalmente tumores con un tamaño letal. El tratamiento con 0,2 y 0,1 ng/ml de raloxifeno no provocó ningún cambio en comparación con el grupo de control con PBS. Únicamente el grupo con 0,4 ng/ml de raloxifeno mostró una tendencia natural a mantener o reducir ligeramente el tamaño del tumor después de un tiempo, lo cual es característico de su modo de acción en una clínica como modulador selectivo de los receptores estrogénicos.

[0075] El tratamiento con 0,2 y 0,1 nM de concentraciones máximas en sangre de raloxifeno:saporina 2:1 (S:R 1:2) también fracasó a la hora de inducir cambios en el crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control con PBS. Sin embargo, el tratamiento con 0,4 nM de raloxifeno:saporina 2:1 (S:R 1:2) provocó una disminución inicial significativa del volumen diario de tumores en comparación con el grupo con 0,4 ng/ml de raloxifeno y con el grupo con PBS (ver Figura 3, el cambio en el volumen diario de tumores en los días 37 y 38); y también provocó una reducción mayor y sostenida de la tasa de crecimiento de tumores en comparación con los resultados obtenidos con el grupo con 0,4 ng/ml de raloxifeno (ver Figura 3, la línea de tendencia de la media móvil).

Ejemplo 5 - Actividad in vitro del conjugado

[0076] El objetivo de este estudio era evaluar los efectos del conjugado sobre las dinámicas de crecimiento de implantes subcutáneos de ZR-75-1 (una línea de células humanas mamarias carcinomatosas con receptores de estrógeno positivos) en ratones desnudos.

[0077] Para este estudio, y puesto que el crecimiento de ZR-75-1 depende del estrógeno, a no menos de 40 ratones hembra desnudos (nu/nu) normales atímicos de 4-6 semanas se les inyectó diariamente 5 mg/kg de estradiol, comenzando 3 días antes de exponerlos a células tumorosas. Después del tratamiento con estradiol, a todos los animales se les inoculó subcutáneamente 25×10^6 células de ZR-75-1 (obtenidas del ATCC) en Matrigel (Becton-Dickinson) usando agujas y jeringuillas de 21G.

[0078] Los pesos corporales y el volumen de tumores se monitorizaron entre 48 y 72 horas durante los 36 días posteriores a la primera administración de las sustancias de prueba. Los volúmenes de tumores se calcularon usando la siguiente fórmula: Volumen de tumores = $(a^2 \times b/2)$, donde 'a' es el diámetro más pequeño y 'b' es el diámetro más grande.

[0079] Una vez que los tumores presentes llegaron aproximadamente a $75 - 150 \text{ mm}^3$ (los volúmenes de tumores individuales pueden ir de 100 a 250 mg), se distribuyó a los ratones en tres grupos de tratamiento ($n=12$ para cada grupo), de manera que los volúmenes medios de tumores entre los siete grupos se encontraban en el 10% del peso medio tumoral del grupo de control. El mismo día (Día 1) a los animales se les inyectó por vía intravenosa 0,1 ml de: (a) el conjugado de saporina-raloxifeno, (b) una mezcla no conjugada de saporina y raloxifeno, o (c) sólo raloxifeno. Este tratamiento se repitió cada 72 horas y un total de 5 veces (Días 1, 3, 6, 9 y 12).

[0080] La cantidad neta de raloxifeno que se inyectó a cada animal fue la misma en los tres grupos, y se preparó para alcanzar una concentración máxima de raloxifeno en sangre de 0,7 ng/ml, una cantidad que se halla dentro del

rango de concentración de raloxifeno en sangre en una clínica. Los animales a los que también se les inyectó saporina, tanto libre como conjugada con raloxifeno, recibieron la misma cantidad de saporina calculada en base a una relación molar 1:2 de saporina:raloxifeno.

5 **[0081]** La dosis de estradiol se reanudó 15 después de la implantación con el objetivo de favorecer el crecimiento normal de los tumores subcutáneos.

10 **[0082]** Se eutanasió a los ratones (mediante asfixia por CO₂) si el animal se encontraba moribundo o si su peso corporal bajaba de 14 g. También se realizó la eutanasia si el volumen individual de tumores llegaba a 3.000 mm³ o si el tumor estaba ulcerado. Durante el estudio, un animal del grupo B (saporina y raloxifeno no conjugados) tuvo que ser retirado del estudio.

15 **[0083]** Los resultados de este estudio sugieren que la administración del conjugado saporina-raloxifeno provoca una reducción significativa ($p < 0.05$, Mann-Whitney) del volumen tumoral máximo obtenido (Día 5) en comparación con la administración de raloxifeno solamente o de raloxifeno y saporina no conjugados.

20 **[0084]** Además, al final del tratamiento (Día 12) y hasta el Día 36, los animales a los que se les administró una dosis de conjugado de saporina-raloxifeno mostraron, en general, una reducción constante de sus volúmenes tumorales en comparación con los otros dos grupos experimentales (ver Figura 4).

25 **[0085]** Se pueden obtener indicaciones de la salud general de un animal observando el peso corporal del animal a lo largo de la realización de un estudio. Por eso, se pesó a los ratones de cada grupo cada 48-72 horas a lo largo de todo el estudio. Los resultados muestran con claridad que los animales a los que se administró el conjugado de saporina-raloxifeno tenían un perfil de aumento de peso significativamente mejor ($p < 0.05$, Mann-Whitney) que los animales a los que se administró sólo raloxifeno o raloxifeno y saporina no conjugados (ver Figura 5).

Ejemplo 6 - Conjugación adicional de raloxifeno con saporina

Experimento A

30 **[0086]** Se conjugó raloxifeno (Sigma) con saporina (Sigma) usando bis-diazo-(o-tolidina) [BDT] como enlazante. Este enlazante es bastante estable en una solución ácida, pero reacciona extremadamente rápido con la tirosina y con otros fenoles aromáticos cuando el pH sube a 7. Por este motivo, la reacción es difícil de controlar. Si no se controla de manera adecuada, el enlazante usará la saporina para crear reticulaciones o enlaces cruzados

35 atravesando las 14 tirosinas presentes en su secuencia y destruirá su integridad. Por lo tanto, las condiciones usadas son importantes.

[0087] Los conjugados se prepararon con una relación raloxifeno:saporina de 2:1.

40 **[0088]** Más abajo se proporciona un método para la conjugación 2:1 (raloxifeno:saporina). Para llevar a cabo la conjugación se disolvió 1,2 mg de saporina liofilizada (que se había tratado levemente con ultrasonidos) en 0,6 ml de agua. A esta solución se le añadió 0,4 ml de DMSO (Sigma) y 0,01 ml de HCl de 1M y se mezcló todo. Después de

45 tratar levemente con ultrasonidos la solución de proteínas resultante, se añadió a la solución entre 0,4 y 1 mg de raloxifeno, y después se añadió un excedente molar de BDT para tirosina (en saporina). El pH de la solución resultante se subió a 6,5 añadiendo el volumen adecuado de una solución molar de hidróxido de sodio en agua (M.NaOHaq) y se permitió que la reacción tuviera lugar durante 22-34 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción, se añadió ácido fosfórico a la solución obteniendo una concentración final de 9 (aproximadamente), y se mezcló todo. La BDT excedente se retiró de la solución cruda de conjugado mediante elución usando una columna de Biogel P2 (BioRad) y usando una solución de 30,4% de DMSO y 9,1% de ácido fosfórico en agua como eluyente.

50 Las partes que contenían saporina y raloxifeno se localizaron mediante una espectrofotometría de UV y fueron sometidas a una diálisis con agua antes de usarse.

Experimento B

55 **[0089]** Se disolvió raloxifeno-HCl y DSC (Di-(N-succinimidil) carbonato; un enlazante que es útil para la unión mediante lisina) con una relación de masa de 2:1 (raloxifeno:DSC) en 0,2 ml de DMF (dimetilformamida). Se añadió trietilamina (0,01 ml) a piridina (0,13 ml) y partes alícuotas (0,01 ml) de esta preparación se añadieron de manera

60 secuencial a la mezcla raloxifeno/DSC durante un periodo de 15 minutos. Este proceso se desarrolló a 21° C y se agitó todo de manera constante. Se preparó una solución de saporina (0,6 mg/ml) mezclándola con una solución amortiguadora de 40% de DMF en 15 mM de fosfato sódico (pH 7,4) y se añadió 0,01 ml de la solución raloxifeno/DSC. La preparación resultante se mezcló primero con un agitador vórtex y luego se trató con ultrasonidos hasta que adoptó una apariencia coloidal antes de dejar que la conjugación reaccionara durante 30 minutos a 21° C. El producto resultante se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos; el sobrenadante clarificado se usó

65 directamente o se pasó a través de una columna con Sephadex G10, se liofilizó y se volvió a suspender en PBS antes de usarse.

Experimento C

- 5 [0090] Se disolvió saporina en una solución amortiguadora de 10 mM de fosfato (pH 6,0) que contenía 2 mg/ml de glucosa y, a la solución resultante, se le añadió 0,1 ml de HCl molar agitando constantemente para reducir el pH a 3,7. A esta preparación se le añadió 1 ml de una solución de raloxifeno-HCl en DMSO (3 mg/ml) agitando constantemente y a 21° C; después, se añadió 0,005 ml del reactivo de BDT. Pequeñas partes alícuotas (0,01 ml) de 0,1 M de NaOH se añadieron de manera secuencial a la preparación saporina-raloxifeno-BDT (removida constantemente) para alcanzar un pH de 6,8; en este punto se permitió que la reacción continuara durante 60 minutos. El producto resultante fue sometido a diálisis durante la noche, primero con agua y después con PBS que 10 contenía 2 mg/ml de glucosa. El precipitado marrón que se creó durante el proceso se recogió y se volvió a disolver en agua aplicando ultrasonidos y agitándolo en vórtex de manera exhaustiva. Después de clarificarlo mediante centrifugación, el sobrenadante se separó en partes alícuotas listas para usarse.

Reivindicaciones

1. Un compuesto que comprende:

- 5 (a) un primer componente, donde el primer componente es un modulador selectivo de los receptores estrogénicos (MSRE); y
(b) un segundo componente, donde el segundo componente es una toxina inactivadora de ribosomas, y

donde el segundo componente está conjugado con el primer componente.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde la toxina inactivadora de ribosomas es una proteína inactivadora de ribosomas de tipo I.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la toxina inactivadora de ribosomas es saporina, momordina (MOM), proteína antiviral de las semillas de *Phytolacca americana* (PAP-S), bouganina o gelonina; y, preferiblemente, donde la toxina es saporina.

4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones previas, donde el MSRE es un compuesto de los siguientes: droloxifeno, fulvestrant, idoxifeno, lasofoxifeno, raloxifeno, tamoxifeno o toremifeno.

5. El compuesto de la reivindicación 4, donde el MSRE es un compuesto de raloxifeno.

6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el primer componente está conjugado covalentemente con el segundo componente; preferiblemente, donde el primer componente está conjugado con el segundo componente mediante un enlazante químico; preferiblemente, donde el enlazante es bis-diazo-(o-tolidina) [BDT].

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la relación estequiométrica del primer componente con el segundo componente va desde 0,5:1 hasta N:1, donde N es el número total de sitios de unión del primer componente con el segundo componente.

8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la relación estequiométrica del primer componente con el segundo componente está en un rango de 0,5:1 a 8:1; preferiblemente, donde la relación estequiométrica del primer componente con el segundo componente está en un rango de 0,5:1 a 2,5:1.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto -tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes- y un portador, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10. Un compuesto o composición, tal y como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en medicina.

11. Un método para la fabricación de un compuesto, tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el método consiste en hacer reaccionar a al primer y segundo componentes para conjugar el primer componente con el segundo componente.

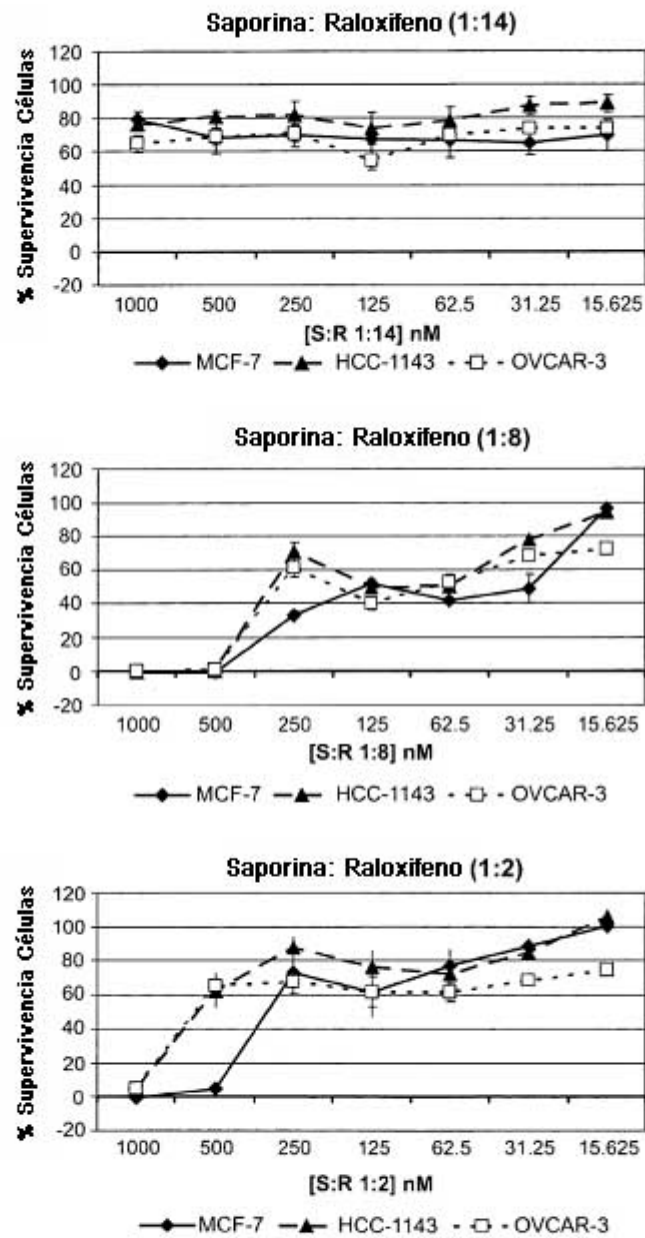
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende el control del pH del primer y segundo componentes durante la conjugación.

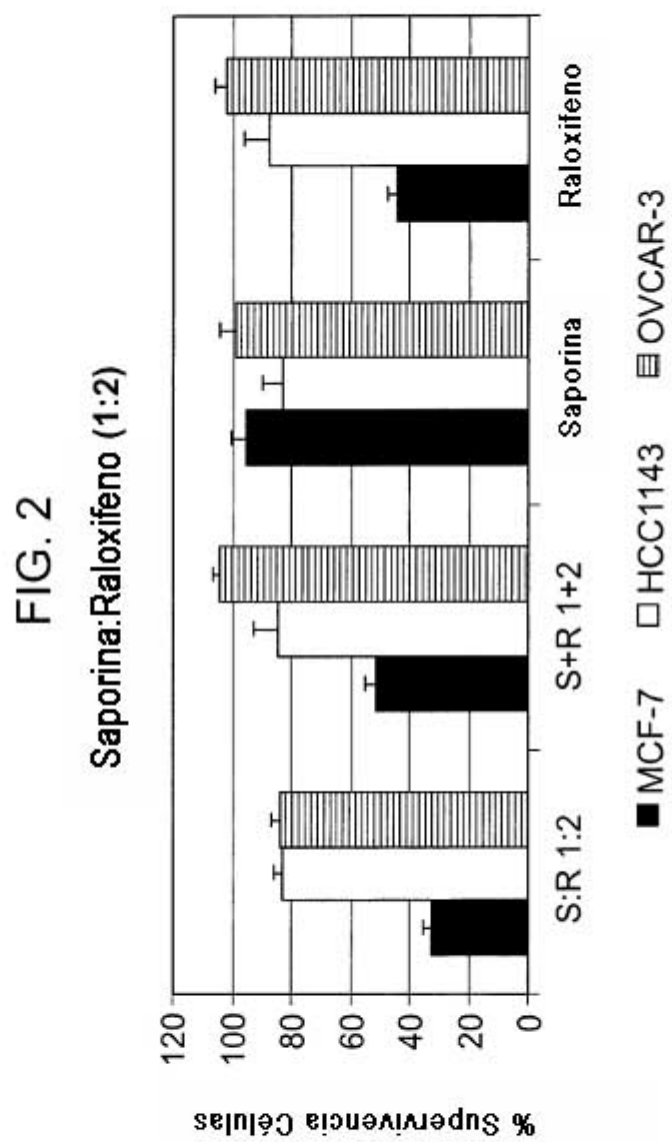
13. Un compuesto o composición, tal y como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en el tratamiento de un cáncer asociado a células cancerosas ER+; preferiblemente, donde el cáncer es un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer cervical u otros cánceres ER+.

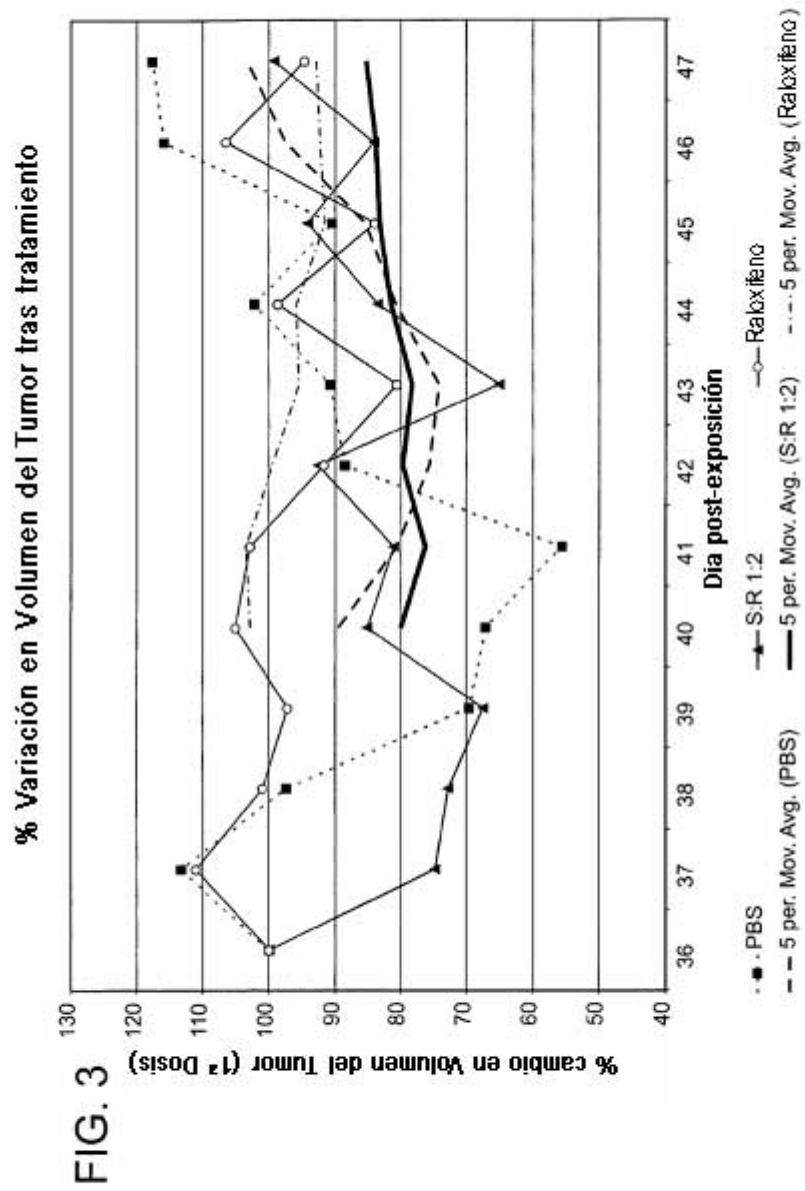
14. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 que es apto para tratar mamíferos; preferiblemente, donde el mamífero es un humano.

15. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14 que es apto para su inyección o infusión (por vía intravenosa o cualquier otra) en un sujeto o para su administración oral en un sujeto; preferiblemente, que es apto para ser inyectado en un sujeto de manera que se obtengan concentraciones máximas del compuesto en la sangre equivalentes al 1% - 500% de la concentración clínica máxima en sangre del primer componente cuando se utiliza en una forma no conjugada; preferiblemente, que es apto para ser inyectado en un sujeto de manera que se obtengan concentraciones máximas del compuesto en la sangre equivalentes al 80% - 140% de la concentración clínica máxima en sangre del primer componente cuando se utiliza en una forma no conjugada.

FIG. 1







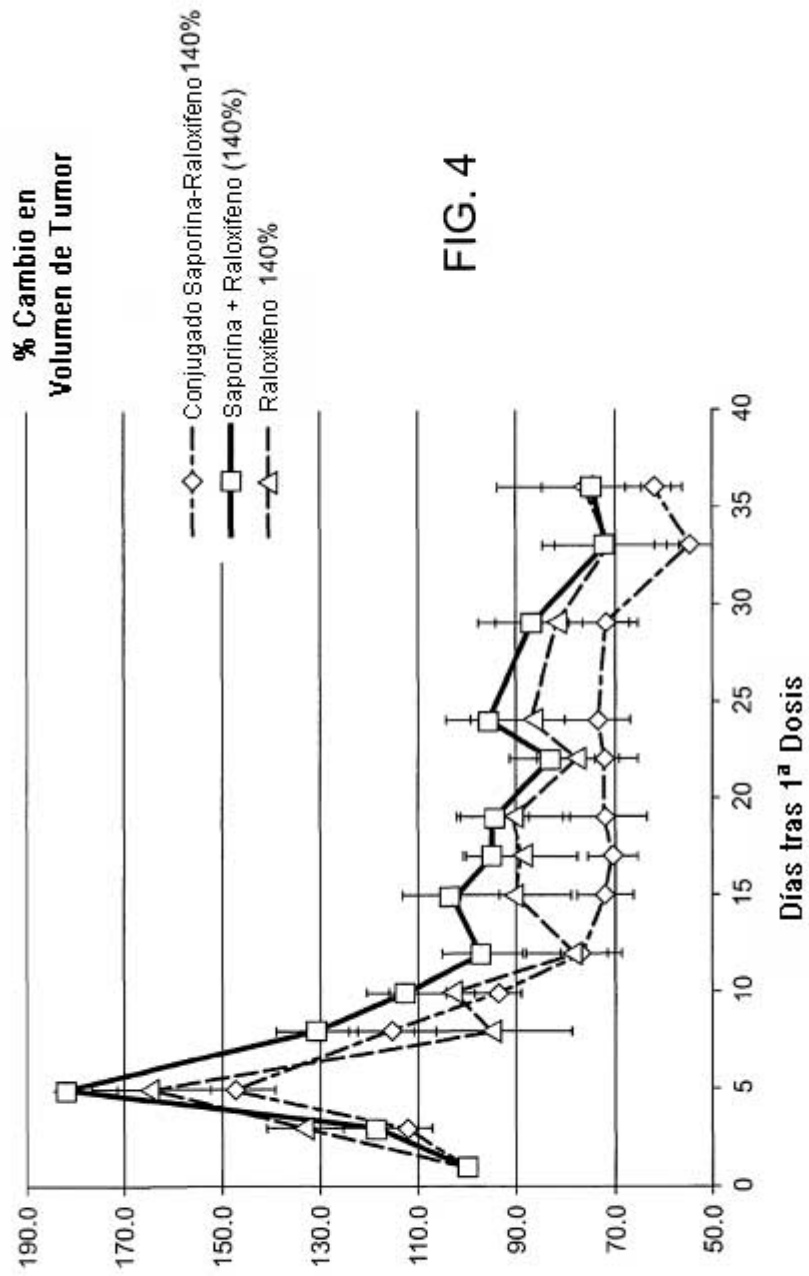


FIG. 4

