

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 555**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11737725 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2528613**

54 Título: **Conjugados de péptido de proteína asociada al receptor inhibidor de fucosidasa y su uso en el tratamiento de tumores hepáticos**

30 Prioridad:

28.01.2010 US 299177 P

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

04.01.2016

73 Titular/es:

**RAPTOR PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
7 Hamilton Landing, Suite 100
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

ZANKEL, TODD C.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 555 555 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de péptido de proteína asociada al receptor inhibidor de fucosidasa y su uso en el tratamiento de tumores hepáticos

Campo de la invención

- 5 La presente descripción se refiere, en general, a métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos hepáticos y tumores hepáticos, tales como el carcinoma hepatocelular, con un conjugado que comprende un péptido de la molécula de proteína asociada al receptor (RAP) y un inhibidor de fucosidasa.

Antecedentes de la invención

- 10 En la glucosilación de proteínas se han observado diferencias entre las células normales y las células tumorales y han sido la base para el desarrollo de anticuerpos selectivos de tumores [1]. Se ha observado que las células de carcinoma hepatocelular (HCC) llevan a cabo la fucosilación de sus glucoproteínas, de una manera significativa e inapropiada, con respecto a los hepatocitos normales [2; 3; 4; 5; 6]. Una gran parte de estas glucoproteínas termina en los lisosomas del tumor, donde se degradan. Un informe ha dado a entender que el aumento de los niveles séricos de alfa-L-fucosidasa lisosómica es predictivo de carcinoma hepatocelular, indicando una posible regulación por incremento de esta enzima por los hepatocitos precancerosos para dar cabida a niveles crecientes de fucosilación de las glucoproteínas en la ruta biosintética [7].

- 15 La inactivación de la alfa-L-fucosidasa lisosómica (FUCA1), por ejemplo, debida a mutaciones génicas heredadas, da como resultado una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD) llamada fucosidosis [8; 9]. Los pacientes que tienen fucosidosis presentan una acumulación lisosómica de material no degradado, ya que son incapaces de degradar lisosómicamente los oligosacáridos fucosilados terminalmente y en el núcleo, y rara vez sobreviven más allá de su sexto año [10].

- 20 La patente de Estados Unidos Nº 5.240.707 describe inhibidores de alfa-manosidasa y de fucosidasa que se especula que son útiles como inmunomoduladores y como agentes antimetastásicos. Otros inhibidores de fucosidasa conocidos incluyen L-desoxifuconojirimicina (DFJ) [11], basada en la estructura clásica del imino azúcar nojirimicina y que tiene una constante de inhibición frente a la fucosidasa lisosómica de 10 nM. Véase también la patente de Estados Unidos Nº 5.100.797 que describe inhibidores adicionales basados en desoxifuconojirimicina (DFJ o DNJ), por ejemplo, beta-L-homofuconojirimicina y 1-beta-C-desoximanojirimicinas sustituidas. Otro inhibidor potente de la fucosidasa es un miembro de la clase de azepanos de siete miembros, ácido ((3R,4R,5S,6S)-1-butil-4,5,6-trihidroxiazepano-3-carboxílico, conocido también como "Faz"). A pesar de tener la configuración de hidroxilo y la funcionalidad de carboxilo de un azúcar iduronato, esta nueva molécula inhibe también la fucosidasa con una potencia en el intervalo de concentración nanomolar baja [12]. Como la mayor parte de los inhibidores de imino azúcares, no se prevé que la modificación con alquilo de la amina afecte significativamente a la potencia del inhibidor [13; 14], lo que permite la conjugación fácil y estable del inhibidor con grandes biopolímeros, tales como péptidos. Los inhibidores de fucosidasa están descritos además en las patentes de Estados Unidos números 35 5.382.709, 5.240.707, 5.153.325, 5.100.797, 5.096.909 y 5.017.704.

Sumario de la invención

- 40 La presente descripción se refiere, en general, a composiciones y métodos para el tratamiento de un trastorno hepático, tal como carcinoma hepatocelular. Las composiciones contempladas comprenden péptidos derivados de la proteína asociada al receptor humano (RAP) conjugados con inhibidores de fucosidasa. Los péptidos RAP se unen al receptor LRP1 en los hepatocitos de hígado dirigiendo de este modo a los inhibidores de la fucosidasa hasta el hígado.

La invención se define en las reivindicaciones.

- 45 En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de péptido como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende un péptido de la proteína asociada al receptor (RAP) unido a un inhibidor de fucosidasa, comprendiendo el péptido RAP una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 80 % de homología con los aminoácidos 210-319 de RAP de la SEQ ID NO: 1. En una realización descrita en la presente memoria, en el péptido RAP faltan al menos 200 y hasta 245 aminoácidos desde el N-terminal de la SEQ ID NO: 1. En una realización relacionada descrita en la presente memoria, en el péptido RAP faltan 245 aminoácidos desde el N-terminal de la SEQ ID NO: 1.

- 50 En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, en el péptido RAP faltan además al menos 4 y hasta 11 aminoácidos desde el C-terminal de la SEQ ID NO: 1. En otra realización descrita en la presente memoria, en el péptido RAP faltan además 11 aminoácidos desde el C-terminal de la SEQ ID NO: 1. En una realización adicional, el péptido RAP carece de los aminoácidos 1-245 y 320-323 del RAP maduro de la SEQ. ID NO: 1.

- 55 En otras realizaciones más descritas en la presente memoria, los péptidos RAP contemplados por la invención pueden estar compuestos por la secuencia RAP nativa o pueden incluir mutaciones a la secuencia nativa. Los péptidos RAP descritos en la presente memoria comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica al

- menos en un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a cualquiera de los péptidos RAP derivados de la SEQ ID NO: 1 como se describe en esta memoria. Los péptidos RAP descritos en esta memoria comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a cualquiera de los aminoácidos 210-319, 243-313, 246-313, 249-303 o 251-303 de RAP indicados en la SEQ ID NO: 1.
- 5 En una realización adicional descrita en la presente memoria, el péptido RAP comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos un 80 % de homología con la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 2. En una realización relacionada, el péptido RAP comprende una secuencia de polipéptidos indicada en la SEQ ID NO: 2.
- 10 Se describen en esta memoria inhibidores de fucosidasa seleccionados del grupo que consiste en un imino azúcar de nojirimicina, un azepano de siete miembros, una (1-alfa,2-beta,3-alfa o beta,4-alfa,5-alfa o beta)-2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)ciclopentilamina sustituida y 2,6-imino-2,6,7-tridesoxi-D-glicero-D-gluco-heptitol.
- 15 También se describen en esta memoria inhibidores de fucosidasa que incluyen imino azúcares de nojirimicina, tales como L-desoxifuconojirimicina (DFJ o DNJ), beta-L-homofuconojirimicina y 1-beta-C-desoximanojirimicinas sustituidas (beta-1-C-metil-desoximanojirimicina, beta -1-C-etil-desoximanojirimicina, beta-1-C-fenil-desoximanojirimicina), y un azepano de siete miembros, tal como ácido ((3R,4R,5S,6S)-1-butil-4,5,6-trihidroxiazepano-3-carboxílico ("Faz"). Los inhibidores de fucosidasa adicionales descritos aquí son (1-alfa,2-beta,3-alfa o beta,4-alfa,5-alfa o beta)2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)-ciclopentilaminas sustituidas y 2,6-imino-2,6,7-tridesoxi-D-glicero-D-gluco-heptitol.
- 20 En una realización, el inhibidor de fucosidasa se selecciona del grupo que consiste en L-desoxifuconojirimicina (DFJ o DNJ), beta-1-C-metil-desoximanojirimicina, beta-1-C-etil-desoximanojirimicina, beta-1-C-fenil-desoximanojirimicina y ácido (3R,4R,5S,6S)-1-butil-4,5,6-trihidroxiazepano-3-carboxílico (Faz).
- En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, el inhibidor de fucosidasa inhibe la alfa-L-fucosidasa *in vitro*, en el intervalo de 1 pM-100 nM, o en el intervalo de 1-100 nM.
- En otra realización, se contempla que el inhibidor de la fucosidasa esté conjugado mediante un enlazador peptídico.
- 25 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el enlazador peptídico es un enlazador pentapéptido o un dendrímero. Los ejemplos de dendrímeros incluyen, pero no se limitan a, dendrímeros de lisina, dendrímeros PAMAM, dendrímeros POPAM, dendrímeros de triazina, y dendrímeros de diaminobutano (DAB).
- En otra realización descrita en la presente memoria, el enlazador peptídico es un dendrímero de lisina. Los dendrímeros de lisina, incluyen, pero no se limitan a un dendrímero de lisina de 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a y 6^a generación, tal como un dendrímero de lisina K4K2K y un dendrímero de lisina KG6. En una realización relacionada, el enlazador peptídico es un dendrímero de lisina K4K2K.
- 30 En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, se conjugan uno o más inhibidores de fucosidasa por molécula de péptido RAP. En una realización relacionada descrita en la presente memoria, la invención contempla que el conjugado de péptido RAP comprende uno o más agentes inhibidores unidos al mismo péptido o a múltiples péptidos RAP. En una realización descrita en la presente memoria, el péptido RAP puede comprender de aproximadamente 1 a 5, aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 5 a 10, aproximadamente 10 a 20, aproximadamente 20 a 30, o 30 o más moléculas de un agente inhibidor para el péptido RAP. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, se contempla que el conjugado RAP comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más moléculas de inhibidor por molécula de péptido RAP. En una realización relacionada descrita en la presente memoria, el conjugado comprende una relación estequiométrica de inhibidor a péptido RAP de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1. Otras relaciones estequiométricas de inhibidor de fucosidasa a péptido RAP incluyen 1:2, 1:3, 3:2, 5:2, 7:2, 9:2, 11:2, 4:3, 5:3, 7:3, 8:3, 10:3, 11:3. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la relación de moléculas de inhibidor a moléculas de péptido RAP está entre 1:1 y 12:1, o entre 1,5:1 y 10:1.
- 35 En otra realización, el conjugado de péptido RAP comprende al menos 4 inhibidores de fucosidasa por molécula de péptido RAP. En una realización adicional, el conjugado de péptido RAP comprende al menos 8 inhibidores de fucosidasa por molécula de péptido RAP.
- En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de un tumor hepático en un sujeto que lo necesite.
- 50 En una realización, el tumor hepático es resultado de un carcinoma hepatocelular, infección por el virus de la hepatitis, cirrosis, daño tóxico hepático, y hemocromatosis hereditaria.
- En una realización relacionada, el tumor hepático es resultado de un carcinoma hepatocelular.

En una realización adicional, el tratamiento produce una disminución en el tamaño del tumor hepático del sujeto. En otra realización, el tratamiento produce una reducción de los niveles de alfa-fetoproteína en la sangre del sujeto en comparación con los niveles antes del tratamiento.

5 En ciertas realizaciones, el conjugado de péptido se administra por vía intravenosa. En una realización relacionada descrita en la presente memoria, el conjugado de péptido se administra a través de la arteria hepática.

10 Todavía en otra realización, el conjugado de péptido se administra en combinación con un segundo agente. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, se selecciona el segundo agente del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un radioisótopo, un agente antivírico, un agente anti-fúngico y un agente anti-inflamatorio. En una realización relacionada, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina y 5-fluorouracilo.

En una realización adicional descrita en la presente memoria, el segundo agente es un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreto de mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, melfalán, busulfán, tiotepa, carmustina, lomustina, dacarbazina y estreptozocina.

15 En otra realización, el segundo agente es un radioisótopo. En alguna realización descrita en la presente memoria, el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ^{131}I , ^{125}I , ^{111}In , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{127}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{255}Fm , ^{149}Tb , ^{223}Rd , ^{213}Pb , ^{212}Pb , ^{211}At , ^{89}Sr , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{225}Ac , ^{186}Re , ^{67}Ga , ^{68}Ga y $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

En una realización, el tumor hepático se asocia con infección por el virus de la hepatitis, y el segundo agente es un agente antivírico.

20 Se contempla también el uso de cualquiera de los conjugados anteriores descritos en esta memoria en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de los trastornos hepáticos descritos aquí. Se contempla también una composición que comprende un conjugado de péptido RAP-fucosidasa como se describe en esta memoria para su uso en el tratamiento de un trastorno hepático. Se contemplan también jeringas, por ejemplo, de un solo uso o jeringas precargadas, envases sellados estériles, por ejemplo, viales, frascos, vasos, y/o kits o paquetes que comprenden cualquiera de los conjugados anteriores, opcionalmente con instrucciones adecuadas para su uso.

25 Cualquiera de los conjugados anteriores descritos en esta memoria se puede administrar concurrentemente con algún agente útil para tratar un trastorno hepático conocido en la técnica o descrito en esta memoria, como terapia complementaria. Se contemplan también las composiciones que comprenden alguno de los conjugados anteriores junto con otros agentes de terapia hepática.

30 Se entiende que cada característica o realización, o su combinación, descritas en la presente memoria es un ejemplo ilustrativo, no limitativo, de cualquiera de los aspectos de la invención y, como tal, se entiende que se puede combinar con cualquier otra característica o realización, o su combinación, descrita en la presente memoria. Por ejemplo, cuando se describen las características con expresiones tales como "una realización", "algunas realizaciones", "realización adicional", "ejemplos de realizaciones específicas" y/o "otra realización", cada uno de estos tipos de realizaciones es un ejemplo no limitativo de una característica que se pretende que se combina con cualquier otra característica o combinación de características, descritas en esta memoria sin tener que listar todas las combinaciones posibles. Dichas características o combinaciones de características se aplican a cualquiera de los aspectos de la invención. Cuando se describen ejemplos de valores que caen dentro de intervalos, ninguno de estos ejemplos se contempla como posible punto final de un intervalo, se contemplan todos y cada uno de los valores numéricos entre dichos puntos finales, y se prevén todas y cada una de las combinaciones de los puntos finales superior e inferior.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 representa el enlazador N-carboxipentil modificado-ácido (3R,4R,5S,6S)-1-butil-4,5,6-trihidroxiazepano-3-carboxílico (Faz).

La Figura 2 ilustra el enlazador N-5-carboxipentil modificado-desoxifuconojirimicina (DNJ).

La Figura 3 es una representación de un conjugado de péptido RAP que comprende un dendrímero de lisina K4K2K y los inhibidores conjugados (= "X").

50 La Figura 4 muestra los efectos de la desoxifuconojirimicina (DNJ) sobre la actividad de fucosidasa en células de carcinoma hepatocelular HepG2 *in vitro*. Se utilizó tampón como control.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un conjugado como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2, que comprende la proteína asociada al receptor (RAP) o un fragmento de la misma o una variante de RAP o un fragmento de RAP, unido a un inhibidor de fucosidasa. La presente invención se refiere también a dichos conjugados para uso en el

tratamiento de tumores hepáticos, particularmente el carcinoma hepatocelular. La parte RAP del conjugado dirige al inhibidor de la fucosidasa a las células hepáticas, y permite el tráfico selectivo del inhibidor de fucosidasa a las células hepatocitos, con absorción en el lisosoma. Sin restringirse con consideraciones teóricas de la invención, el inhibidor de fucosidasa induce la acumulación de oligosacáridos derivados de glucoproteína en el lisosoma, similar a los efectos de una enfermedad de almacenamiento lisosómico en las células del hígado, induciendo de este modo un suceso citotóxico en las células.

Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que es comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale and Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

Se hace notar aquí que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se usan en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos a menos que se especifique otra cosa.

"Inhibidor de fucosidasa" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un agente, por ejemplo, una molécula pequeña, que inhibe la actividad de la alfa-L-fucosidasa para escindir los residuos de fucosa de las glucoproteínas. Los inhibidores de fucosidasa descritos en la presente memoria, incluyen los imino azúcares de nojirimicina, tales como desoxifuconojirimicina (DFJ o DNJ), desoximanojirimicina (DMJ) y sus derivados. Los derivados específicos incluyen beta-L-homofuconojirimicina y 1-beta-C-desoximanojirimicinas sustituidas (beta-1-C-metil-desoximanojirimicina, beta-1-C-etil-desoximanojirimicina, beta-1-C-fenil-desoximanojirimicina). Los inhibidores de fucosidasa descritos en la presente memoria, incluyen también moléculas de azepano de siete miembros, tal como ácido ((3R,4R,5S,6S)-1-butyl-4,5,6-trihidroxi-azepano-3-carboxílico ("Faz"). Inhibidores adicionales de fucosidasa están descritos en las patentes de Estados Unidos 5.382.709, 5.240.707, 5.153.325, 5.100.797, 5.096.909 y 5.017.704, incluyendo (1-alfa,2-beta,3-alfa o beta,4 alfa,5-alfa o beta)-2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)-ciclopentilaminas sustituidas y 2,6-imino-2,6,7-tridesoxi-D-glicero-D-gluco-heptitol. El término "inhibidor de fucosidasa" incluye específicamente cualquiera de los inhibidores y sus derivados descritos en la sección titulada "Inhibidores de alfa-L-fucosidasa y de fucosidasa" más adelante.

La expresión "Tumores hepáticos" como se usa aquí incluye tanto los tumores primarios y/o neoplasias como las metástasis que se desarrollan en o sobre el hígado o se asocian físicamente con el hígado. También incluye metástasis de tumores hepáticos que migran a otras partes del cuerpo, pero siguen siendo sensibles a los conjugados de péptidos RAP con inhibidores de fucosidasa. Se conocen muchos tipos de tales tumores y neoplasia. Los tumores primarios de hígado incluyen el carcinoma hepatocelular y otros conocidos en la técnica. Estos tumores son generalmente tumores sólidos, o son tumores difusos con acumulaciones localizadas en el hígado. Los tumores o neoplasias pueden ser malignos o benignos, y pueden haber sido tratados previamente con quimioterapia, radiación y/u otros tratamientos.

El término "cantidad eficaz" significa una dosis suficiente para producir el resultado deseado sobre la condición de salud, la patología y la enfermedad de un sujeto o para fines de diagnóstico. El resultado deseado puede comprender una mejoría subjetiva u objetiva en el receptor de la dosis. "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un agente eficaz para producir el efecto beneficioso que se pretende sobre la salud. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede incluir una cantidad eficaz para hacer más lento el crecimiento de un tumor sólido o para reducir su tamaño. Una cantidad eficaz puede reducir las metástasis tumorales. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para hacer más lenta la velocidad de proliferación de las células cancerosas, para detener la proliferación de las células cancerosas, o para matar a las células cancerosas.

"Molécula orgánica pequeña" se refiere a las moléculas orgánicas de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en los productos farmacéuticos. El término excluye los biopolímeros orgánicos (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, hasta aproximadamente 2000 Da, o hasta aproximadamente 1000 Da.

Un "sujeto" de diagnóstico o de tratamiento es un ser humano o un animal, incluyendo un mamífero o un primate.

"Tratamiento" se refiere a tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico o tratamiento de diagnóstico.

Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o presenta solamente signos precoces con el fin de reducir el riesgo de desarrollar la patología. Los compuestos

conjugados de la invención se pueden administrar como un tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de desarrollar una patología o para minimizar la gravedad de la patología, si se desarrolla.

5 Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos o síntomas de patología con el fin de disminuir o eliminar estos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales, subjetivos u objetivos. Los compuestos conjugados de la invención se pueden administrar como un tratamiento terapéutico o para diagnóstico.

10 "Diagnóstico" significa la identificación de la presencia o naturaleza de una condición patológica. Los métodos de diagnóstico difieren en su especificidad y selectividad. Aunque un método particular de diagnóstico puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

15 "Composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto animal, incluyendo los seres humanos y los mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un péptido RAP conjugado con un agente activo, y comprende también un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica engloba una composición que comprende el ingrediente o ingredientes activos, y el ingrediente o ingredientes inertes que constituyen el vehículo, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualquiera de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria engloban cualquier composición preparada mezclando un compuesto conjugado de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración parenteral deben ser estériles.

25 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los vehículos, tampones, y excipientes farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, solución acuosa de dextrosa al 5 % y emulsiones, tal como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, y diversos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Los vehículos y las formulaciones farmacéuticas adecuadas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los vehículos farmacéuticos preferidos dependen del modo de administración que se pretende para el agente activo. Los modos típicos de administración incluyen la administración enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; o administración tópica, transdérmica, o transmucosal). Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que se puede formular en un compuesto para uso farmacéutico incluyendo, por ejemplo, sales de metales (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

35 El término "forma farmacéutica unitaria", como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas farmacéuticas unitarias dependen del conjugado particular empleado y del efecto a alcanzar, y de la farmacodinamia asociada con cada compuesto en el hospedante. Por ejemplo, una forma farmacéutica unitaria para administración oral puede ser un comprimido, cápsula o píldora, o grupo de los mismos. Una forma farmacéutica unitaria para administración parenteral puede ser un vial o jeringa o bolsa precargada que contiene una cantidad fija de dosis en mg.

"Modular", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad para alterar, por aumento o disminución (por ejemplo, actuar como antagonista o agonista).

45 "Incremento de administración relativa" tal como se utiliza aquí se refiere al efecto por el cual la acumulación en el sitio de administración previsto (por ejemplo, el hígado) de un conjugado que comprende el péptido RAP y el inhibidor de fucosidasa se incrementa con respecto a la acumulación del inhibidor no conjugado.

"Índice terapéutico" se refiere al intervalo de dosis (cantidad y/o tiempo) por encima de la cantidad terapéutica mínima y por debajo de una cantidad inaceptablemente tóxica.

"Dosis equivalente" se refiere a una dosis, que contiene la misma cantidad de agente activo.

50 "Polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto de unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, tales como ácido desoxirribonucleico ("DNA") y ácido ribonucleico ("RNA"), así como análogos de ácido nucleico. Los análogos de ácido nucleico incluyen aquellos que incluyen bases que no son de origen natural, nucleótidos que se ajustan en conexiones con otros nucleótidos distintos del enlace fosfodiéster de origen natural o que incluyen bases unidas a través de conexiones distintas de los enlaces fosfodiéster. Por lo tanto, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil-ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA), y similares. Tales polinucleótidos se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando un sintetizador automático de DNA. El término "ácido nucleico" se refiere normalmente a polinucleótidos grandes. El

término "oligonucleótido" se refiere normalmente a polinucleótidos cortos, generalmente no mayores que aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos se representa por una secuencia de DNA (esto es, A, T, G, C), esta incluye también una secuencia de RNA (esto es, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza a "T". Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y RNA pueden incluir intrones.

5 "cDNA" se refiere a un DNA que es complementario o idéntico a un mRNA, tanto en forma de cadena sencilla o de cadena doble.

"Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o emparejamiento conjunto de las superficies de interacción de dos polinucleótidos. Un primer polinucleótido es complementario de un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es idéntica a la secuencia de nucleótidos del compañero de unión polinucleotídica del segundo polinucleótido. Por lo tanto, el polinucleótido cuya secuencia es 5'-TATAC-3' es complementario de un polinucleótido cuya secuencia es 5'-GTATA-3'. Las secuencias de polinucleótidos pueden ser totalmente complementarias (esto es, 100 % de emparejamiento) o parcialmente complementarias.

Un ejemplo de las condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios sobre un filtro en una transferencia Southern o Northern es formalina al 50 % con 1 mg de heparina a 42 °C, siendo realizada la hibridación durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con 0,2 × SSC a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook et al. para una descripción del tampón SSC).

"Polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que en la naturaleza no están unidas juntas. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado se puede incluir en un vector adecuado, y el vector se puede utilizar para transformar una célula hospedante apropiada. Una célula hospedante que comprende el polinucleótido recombinante se denomina una "célula hospedante recombinante". El gen se expresa en la célula hospedante recombinante para producir, por ejemplo, un "polipéptido recombinante." Un polinucleótido recombinante puede cumplir también una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión a ribosoma, etc.).

"Secuencia de control de la expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos en un polinucleótido que regula la expresión (transcripción y/o traducción) de una secuencia de nucleótidos unida operativamente a la misma. "Unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos partes en las que la actividad de una parte (por ejemplo, la capacidad para regular la transcripción) da como resultado una acción sobre la otra parte (por ejemplo, la transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de la expresión pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, secuencias de promotores (por ejemplo, inducibles o constitutivos), potenciadores, terminadores de transcripción, un codón de inicio (esto es, ATG), señales de corte y empalme para intrones, y codones de parada.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a ser expresada. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula hospedante o sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

"Polipéptido" se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, a variantes estructurales relacionadas de origen natural y a análogos sintéticos de los mismos que no son de origen natural unidos mediante enlaces peptídicos, a variantes estructurales relacionadas de origen natural, y a análogos sintéticos de los mismos que no son de origen natural. Los polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de polipéptidos automático. El término "proteína" se refiere típicamente a polipéptidos grandes. El término "péptido" se refiere típicamente a polipéptidos cortos.

"Péptido RAP" o "polipéptido RAP" se refiere a fragmentos o variantes de alfa-2-macroglobulina/proteína 1 asociada a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (RAP) de la SEQ ID NO: 1 o a otras formas polimórficas de la misma de origen natural, número de acceso Uniprot P30533, números de acceso Pfam PF06400 y PF06401. Las variantes de polipéptidos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos, en comparación con el polipéptido parental o de referencia, sobre la base de una o más mutaciones que implican la inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras basadas en las relaciones físico-químicas o funcionales del aminoácido que se va a reemplazar y del aminoácido que lo reemplaza. Cuando se utiliza aquí, el término "péptido RAP" se entiende que se refiere a fragmentos de RAP de la SEQ ID NO: 1, y a variantes sustancialmente homólogas de tales fragmentos que conservan la selectividad relativa para el hígado. Los péptidos RAP preferidos tienen menos de aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, o menos de aproximadamente 175, 150, 125 o 100 aminoácidos de longitud, y son idénticos al menos en un 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % con al menos 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 aminoácidos de RAP. Los péptidos RAP preferidos son sustancialmente homólogos al dominio 3 de RAP. Tales péptidos conservan selectividad relativa para el hígado mediante, por ejemplo, la unión a LRP1 con una afinidad de

10^{-5} M o mejor (esto es, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, o inferior). El término "péptido RAP" incluye específicamente cualquiera de los péptidos descritos en la sección titulada "Péptidos RAP" más adelante.

5 Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

10 La frase "sustancialmente homólogo" o "sustancialmente idéntico" en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere en general a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos un 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de nucleótidos o de residuos de aminoácidos, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Preferiblemente, la identidad sustancial existe en una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80 o 90 residuos de longitud, o en una región de al menos aproximadamente 100 residuos, o en una región de al menos aproximadamente 150 residuos. Las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud del biopolímero de referencia indicado. En algunas realizaciones, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de ambos biopolímeros de comparación.

15 Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuenciación. El algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros diseñados del programa.

20 El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual. Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990).

25 "Sustancialmente puro" o "aislado" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (esto es, en una base molar, es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura significa que aproximadamente 80 % a 90 % o más de las especies macromoleculares presentes en la composición es la especie purificada de interés. La especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición por métodos de detección convencionales) si la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. Las especies de disolventes, moléculas pequeñas (<500 daltons), estabilizantes (por ejemplo, BSA), y especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares para los fines de esta definición. En algunas realizaciones, los conjugados de la invención son sustancialmente puros o aislados. En algunas realizaciones, los conjugados descritos en la presente memoria son sustancialmente puros o aislados con respecto a los materiales de partida macromoleculares utilizados en su síntesis. La composición farmacéutica descrita aquí puede comprender un conjugado sustancialmente purificado o aislado de un péptido RAP y el agente activo mezclado con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

30 De "origen natural" cuando se aplica a un objeto se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio, es de origen natural.

35 Un "enlazador" se refiere a una molécula que une otras dos moléculas, o covalentemente o por medio de enlaces iónicos, de Van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia complementaria en el extremo 5' y con otra secuencia complementaria en el extremo 3', uniendo de este modo dos secuencias no complementarias. En ciertas realizaciones, se contempla que el enlazador es un enlazador peptídico que une las moléculas mediante un enlace peptídico.

40 "Tumores" o "neoplasia" o "cáncer" como se utiliza aquí incluyen tanto los tumores primarios como las metástasis. Los tumores incluyen, por ejemplo, carcinomas de ovario, del cuello uterino, de próstata, de mama, de pulmón, de colon o gástricos y metástasis de los mismos en el hígado.

Péptidos RAP

La molécula RAP se produce inicialmente como una proteína de 357 aminoácidos (número de acceso Uniprot P30533) que tiene una secuencia señal de 35 aminoácidos que se escinde para formar el RAP maduro que es un péptido de 323 aminoácidos. La secuencia de 323 aminoácidos del RAP maduro se indica en la SEQ ID NO: 1. El RAP maduro retiene también una señal de retención en el retículo endoplásmico del C-terminal de 4 aminoácidos.

El RAP es funcionalmente bidentado, con la unión de ambos dominios, el primero y el tercero (d1 y d3), con baja afinidad nanomolar a determinados pares en tándem de las repeticiones de tipo complemento (CR) dentro del LDLR (Andersen et al., *Biochemistry* 40, 15408-15417, 2001). El dominio 3 (d3), que consiste en aproximadamente 110 aminoácidos, corresponde a los aminoácidos 210 a 319 de la SEQ ID NO: 1. El uso de fragmentos tiende a minimizar la inmunogenicidad, a maximizar la eficiencia de producción y a mejorar la potencia. Sin embargo, el d3 aislado no se une tan fuertemente al receptor como lo hace el d3 dentro del contexto del RAP de longitud completa. Las secuencias adicionales, que se encuentran dentro de la región N-terminal de d3 y la región C-terminal de d2, son necesarias para asegurar el solapamiento estable y la unión de alta afinidad al receptor. (Lazic et al., *Biochemistry* 42, 14913-14920, 2003). Los datos estructurales derivados del complejo entre RAP d3 y LDLR CR34 (Fisher et al., *Mol Cell* 22, 277-283, 2006) indica que las secuencias de unión al receptor de RAP d3 se encuentran dentro de dos hélices alfa antiparalelas de aproximadamente igual longitud unidas por un bucle flexible.

El RAP ciclado que comprende un enlace disulfuro no nativo ha sido creado conectando los extremos de las dos hélices antiparalelas que forman la unidad de unión al receptor de RAP d3. [Véanse las solicitudes de patentes del mismo propietario números PCT/US2008/057863 (WO 2008/16171) y PCT/US2007/78792 (WO 2008/036682)]. En algunas realizaciones, el péptido ciclado tiene una longitud de aproximadamente 75 aminoácidos, pero tiene mejor afinidad de unión en comparación con el péptido no ciclado y una afinidad comparable al RAP d3 de 110 aminoácidos. Un ejemplo de péptido se deriva de los aminoácidos 246 a 313 del RAP humano, con sustituciones de aminoácidos como sigue: E246C, L247G, G280A, L311A, y S312C. La secuencia de este péptido se indica en la SEQ ID NO: 2. Otros péptidos a modo de ejemplo son, p. ej., idénticos al menos en aproximadamente un 80 % a los aminoácidos 247-311 de la SEQ ID NO: 1 o idénticos al menos en aproximadamente un 80 % a los aminoácidos 251-303 de la SEQ ID NO: 1 y están unidos por enlaces Cys-Cys en los terminales o cerca de los terminales N y C (por ejemplo, dentro de aproximadamente 5 aminoácidos de los extremos).

La caracterización de la SEQ ID NO: 2 muestra que este péptido cíclico se une a LRP1 con una afinidad de aproximadamente 3,5 nM (véase el documento WO 2008/116171). El documento WO 2008/116171 describe otros péptidos RAP cíclicos que se unen a LRP1. Por ejemplo, el péptido mRAP-8c (aminoácidos 246 a 312 de RAP que tienen sustituciones de aminoácidos como sigue: E246C, L247G y L311G y S312C) (SEQ ID NO: 3) se une al receptor LRP1 (agregado II) con afinidad de aproximadamente 4 a 6 nM. El péptido mRAPc (RAP d3 con las siguientes modificaciones: A242G, R314G, E241C y I315C) (SEQ ID NO: 4), se une a LRP1 con una afinidad de aproximadamente 10 nM, mientras que el péptido mRAP14c (que comprende los residuos 250-309 de RAP que tiene las siguientes sustituciones de aminoácidos: F250C, L308G y Q309C) presentaba una afinidad por LRP1 de aproximadamente 21 nM. Todos estos péptidos RAP se contemplan para uso en la invención.

La conjugación de dichos péptidos se describe también en el documento WO 2008/116171. Dichos conjugados pueden incluir un enlazador pentapéptido, GGSGG (SEQ ID NO: 5). En realizaciones a modo de ejemplo, los conjugados se generan por conjugación de un resto con la glicina N-terminal del propio péptido RAP o del enlazador pentapéptido. Alternativamente, se pueden añadir una o más lisinas al N-terminal del péptido o enlazador, y se conjugan restos químicos (por ejemplo, compuestos terapéuticos) con estas lisinas. Por ejemplo, un conjugado de péptido comprende una lisina N-terminal modificada por la adición de una lisina (K₁) conectada además a dos lisinas (K₂, K₃), cada una de ellas conjugada con dos restos químicos. La primera lisina (K₁) está conectada también a un residuo de ornitina que comprende dos restos químicos, y está conectada además a un residuo de lisina final (K₄) conjugada con dos restos químicos.

Estos péptidos se pueden conjugar fácilmente con múltiples inhibidores de fucosidasa, incluyendo los inhibidores de fucosidasa DFJ y Faz. La conjugación de múltiples moléculas de inhibidor con un péptido debería llevar a una inhibición extremadamente potente de la fucosidasa lisosómica, un homotetrámero con múltiples sitios activos [17], mediante la adición de efectos de avidéz a las ya altas afinidades de DFJ y de Faz para la enzima. Se contempla que se conjugan al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30 o más moléculas de inhibidor por molécula de péptido monomérico o de péptido multimerizado. En algunas realizaciones, la relación de moléculas de inhibidor a moléculas de péptido RAP está entre 1:1 y 12:1, o entre 1,5:1 y 10:1.

Es de esperar que los conjugados de péptido RAP sufran una rápida absorción y tránsito al lisosoma de los hepatocitos, donde deberían estar plenamente activos con o sin posterior degradación lisosómica del conjugado. Sin restringirse con consideraciones teóricas, se piensa que a través de este mecanismo la fucosidosis tipo LSD es inducida en los hepatocitos, con esperanza de una mejoría significativa del efecto LSD en los hepatocitos tumorales, como resultado de la hiperfucosilación de las glucoproteínas en estas células. Este enfoque representa un nuevo medio de tratamiento del carcinoma hepatocelular a la vez que se evitan otros tejidos no hepáticos y el tejido hepático normal.

Los péptidos RAP descritos en la presente memoria incluyen aquellos fragmentos RAP y variantes de polipéptidos descritos en la patente de Estados Unidos N° 5.474.766 y en la solicitud de patente internacional N° PCT/US2006/36453. Los péptidos RAP se producen utilizando cualquiera de los métodos de preparación y purificación de proteínas conocidos por los expertos en la técnica.

5 En la secuencia de aminoácidos de los péptidos RAP (incluyendo los péptidos RAP cíclicos) descrita en la presente memoria pueden faltar al menos 200 y hasta 248 aminoácidos desde el N-terminal del RAP maduro. Por lo tanto, en el péptido RAP pueden faltar los aminoácidos 1-209, 1-220, 1-225, 1-230, 1-235, 1-240, 1-241, 1-242, 1-243, o, alternativamente, 1-244, 1-245, 1-246, 1-247, o 1-248 del RAP maduro. En la secuencia de aminoácidos del péptido RAP pueden faltar además al menos 4 y hasta 11 aminoácidos desde el C-terminal del RAP maduro. Por lo tanto, en el péptido RAP pueden faltar los aminoácidos 314-323 o 313-323, o, alternativamente, 304-323, 305-323, 306-323, 307-323, 308-323, 309-323, 310-323, 311-323 o 312-323 del RAP maduro. La secuencia de aminoácidos del péptido RAP puede comprender una porción continua del dominio 3 de RAP maduro que tiene (a) al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, u 85 aminoácidos de longitud y (b) que comprende los aminoácidos 256-270. Las porciones a modo de ejemplo de RAP que pueden formar la base para un péptido RAP (incluyendo péptido RAP cíclico) incluyen los aminoácidos 210-323, 221-323, 210-319, 221-319, 243-319, 244-319, 245-319, 246-319, 247-319, 248-319, 249-319, 210-313, 221-313, 243-313, 244-313, 245-313, 246-313, 247-313, 248-313, 249-313, 210-303, 221-303, 243-303, 244-303, 245-303, 246-303, 247-303, 248-303, o 249-303 de RAP maduro (SEQ ID NO: 1).

20 Otras realizaciones de péptidos RAP contempladas comprenden un polipéptido RAP humano o de mamífero en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos nativos de RAP en las posiciones 282-289, 201-210, y 311-319. Las variantes mutadas, y las variantes truncadas en N-terminal o C-terminal de RAP que se unen al receptor LRP están descritas en Melman et al. (J. Biol Chem. 276 (31): 29338-46, 2001). Otros polipéptidos RAP contemplados comprenden una secuencia nativa de RAP entre los aminoácidos 85-148 y 178-248. (Véase Farquhar et al, Proc Nat Acad Sci USA 91: 3161-3162 (1994).

25 También se describe en la presente memoria un péptido RAP o péptido RAP cíclico de diversos tamaños, incluyendo aproximadamente 103, aproximadamente 99, aproximadamente 95, aproximadamente 90, aproximadamente 85, aproximadamente 82, aproximadamente 80, aproximadamente 78, aproximadamente 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, o 56 aminoácidos de longitud o menos. Si el péptido es un péptido RAP cíclico, el enlace covalente se puede formar entre aminoácidos que están separados por aproximadamente 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, o 56 aminoácidos. Se entiende que estos fragmentos que forman la base para los péptidos RAP pueden incluir otras inserciones o sustituciones, siempre que sean sustancialmente homólogas a los mismos.

30 Como se describe en el documento WO 2008/116171, se pueden preparar péptidos RAP cíclicos que presentan una afinidad y selectividad para LRP1 que es similar a la del RAP nativo (por ejemplo, aproximadamente una diferencia de 5 veces o menos en comparación con el RAP nativo). Se pueden preparar también péptidos RAP cíclicos que presentan mejor afinidad para LRP1 en comparación con el RAP nativo. En una realización, el péptido RAP cíclico presenta al menos una afinidad al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces, 10 veces, o 20 veces mejor (con respecto al RAP nativo) para LRP1 (P98157).

35 Los péptidos RAP pueden estar compuestos por la secuencia RAP nativa o pueden incluir mutaciones de la secuencia nativa. Los péptidos RAP descritos en esta memoria comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a cualquiera de los péptidos RAP derivados de la SEQ ID NO: 1 como se describe aquí. Los péptidos RAP descritos en esta memoria comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a cualquiera de los aminoácidos 210-319, 243-313, 246-313, 249-303 o 251-303 de RAP indicado en la SEQ ID NO: 1.

40 Se pueden preparar péptidos RAP cíclicos que contienen sustituciones conservadoras (por ejemplo, hasta 5, hasta 10, hasta 15, hasta 20 o hasta 25) con respecto a la secuencia de RAP nativo, pero que conservan todavía la afinidad de unión para LRP1. Los péptidos RAP que contienen sustituciones no conservadoras pueden retener también la afinidad de unión para LRP1. Por ejemplo, se ha demostrado que una mutación no conservadora en una cualquiera de las posiciones 217, 249, o 251 de RAP maduro no afecta a la afinidad de unión. También se han realizado mutaciones no conservadoras y conservadoras en las posiciones 241, 242, 247, 250, 308, 309, 311, 314.

45 En cualquiera de las realizaciones precedentes, los péptidos RAP pueden contener una cisteína en el N-terminal o cerca del N-terminal del péptido y una cisteína en el C-terminal o cerca del C-terminal del péptido (por ejemplo, dentro de 3, 4 o 5 aminoácidos del terminal), lo que permite la ciclación del péptido y la estabilización de las hélices alfa a través de la formación de enlace disulfuro entre las dos cisteínas. Opcionalmente, se puede interponer una glicina o una prolina entre las cisteínas y las hélices alfa (por ejemplo, Cys-Gly en el N-terminal y Gly-Cys en el C-terminal). La introducción de glicinas permite una ruptura en la hélice alfa para un enlace disulfuro adyacente inter-helicoidal no nativo.

55 Se contempla además que cualquiera de los péptidos RAP descritos en esta memoria es multimerizado en combinaciones de oligómeros como se describe en la presente memoria. "Péptido RAP multimerizado" como se

utiliza aquí se refiere a un polipéptido que comprende 2 o más péptidos RAP. Los términos "multímero" y "oligómero" se utilizan indistintamente en la presente memoria. En una realización, el oligómero o el multímero comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o al menos ocho péptidos RAP cíclicos. En una realización a modo de ejemplo, los péptidos RAP cíclicos se conjugan con una molécula de biotina para facilitar la multimerización u oligomerización. Los péptidos cíclicos conjugados con biotina pueden ser multimerizados entonces mediante unión a estreptavidina o mediante unión a un anticuerpo anti-biotina. Se pueden preparar también oligómeros o multímeros de péptidos RAP cíclicos por otros métodos bien conocidos en la técnica y que se describen a continuación.

Se conocen una serie de métodos en la técnica para crear multímeros u oligómeros de péptidos. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir mediante enlazadores como se describe en esta memoria, o por medio de polietilenglicol. Véase Zhang et al., *Bioconjug Chem.* 14: 86-92, 2003 (péptidos que se unen a fibrillas de amiloide conectados o por un espaciador de poli(etilenglicol) (PEG) o por sólo dos aminoácidos que presentan aproximadamente una afinidad 100 veces mayor para las fibrillas, mientras que la colocación de seis copias del péptido sobre un PEG ramificado dio como resultado una afinidad 10000 veces mayor). Los péptidos pueden ser multimerizados fácilmente después de biotilación a través de acoplamiento con estreptavidina. Véase, por ejemplo, Guillaume et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 4500-4509, 2003 (se pueden preparar multímeros de péptidos mediante unión a través de avidina o derivados de avidina, y son posibles preparaciones homogéneas de tetrámeros y octámeros). Los péptidos con capacidad de unión al receptor se pueden injertar en diferentes regiones CDR de un anticuerpo o inmunoglobulina andamio. Véase Frederickson et al., *Proc Natl Acad Sci U:S:A.* 103: 14307-12, 2006, que describe anticuerpos y fragmentos que contienen dos péptidos de unión al receptor MPL injertados que estimulan el receptor MPL de una manera que se estima que es equipotente al ligando nativo. Los péptidos se pueden unir en tándem o de forma ramificada, con o sin enlazadores, a los dominios de anticuerpo Fc. Véase la publicación internacional N° WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000. Los péptidos y otras proteínas se pueden presentar sobre un andamio macromolecular derivado de un complejo multienzimático. Véase Domingo et al., *J Mol Biol.* 305: 259-67, 2001. Para una revisión de los andamios de proteínas adecuados para la visualización de péptidos, véase Hosse et al, *Protein Science* 15: 14-27, 2006 (revisión de andamios tal como el dominio de fibronectina de tipo III, una lipocalina, una knottina, citocromo b562, un inhibidor de la proteasa de tipo Kunitz, el dominio Z, y el módulo de unión a carbohidratos CBM4-2).

En algunas realizaciones a modo de ejemplo, las combinaciones oligoméricas bivalentes se preparan por homodimerización de un polipéptido que comprende un péptido RAP cíclico y una región de anticuerpo Fc. Las combinaciones oligoméricas tetravalentes se preparan reemplazando las regiones variables de anticuerpo en una inmunoglobulina tetramérica (que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) con un péptido RAP cíclico. Aún en otras realizaciones a modo de ejemplo, las combinaciones oligoméricas bivalentes, trivalentes, tetravalentes, u otras se preparan por conjugación del péptido RAP cíclico con una molécula de PEG. Otras combinaciones oligoméricas pueden ser previstas por los expertos en la técnica.

Los dendrímeros son también adecuados para la multimerización de los péptidos RAP. Los dendrímeros son polímeros macromoleculares altamente ramificados, a menudo esféricos. Las estructuras oligoméricas tridimensionales de los dendrímeros se preparan por secuencias de reacción reiterativas partiendo de una molécula núcleo que tiene múltiples grupos reactivos. Cuando las unidades de monómero, que tienen también múltiples grupos reactivos, se hacen reaccionar con el núcleo, aumenta el número de grupos reactivos que comprenden los límites exteriores del dendrímero. Se pueden añadir capas sucesivas de moléculas de monómero a la superficie del dendrímero, aumentando geoméricamente el número de ramificaciones y grupos reactivos sobre la superficie cada vez que se añade una capa. El número de capas de moléculas de monómero en un dendrímero se puede denominar como la "generación" del dendrímero. El número total de grupos funcionales reactivos sobre la superficie externa de un dendrímero depende del número de grupos reactivos que posee el núcleo, del número de grupos reactivos que poseen los monómeros que se utilizan para hacer crecer el dendrímero, y de la generación del dendrímero. Véase la patente de Estados Unidos N° 6.852.842.

Se han descrito en la técnica una variedad de tipos de dendrímeros, tales como los dendrímeros de lisina, que incluyen pero no se limitan a un dendrímero de lisina de 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª o 6ª generación, tal como un dendrímero de lisina K4K2K y un dendrímero de lisina KG6 (Okuda et al., *J. Controlled Release* 116, 330-336, 2006). Otros dendrímeros incluyen dendrímeros PAMAM, dendrímeros POPAM, dendrímeros de triazina, y dendrímeros de diaminobutano (DAB). Véase, por ejemplo, Grayson and Frechet, *Chem Rev.* 2001, 101, 3819; Mintzer et al., *New J Chem.* 2009; 33: 1918-1925; Patente de Estados Unidos N° 6.852.842; Publicaciones de Estados Unidos Nos. 20090287005, 20090240028 y 20090182151.

Conjugados RAP

Un "conjugado RAP" o "conjugado de péptido RAP", se refiere cada uno a un compuesto que comprende un péptido RAP unido a un agente activo, tal como un inhibidor de fucosidasa. Como se utiliza en esta memoria, el término "conjugado" significa que el agente o agentes inhibidores y el péptido RAP están unidos físicamente, por ejemplo, mediante enlaces químicos covalentes, fuerzas físicas tales como fuerzas de van der Waals o interacciones hidrófobas, encapsulación, inclusión, o combinaciones de las mismas. En realizaciones preferidas, el agente o agentes inhibidores y el péptido RAP están unidos físicamente por enlaces químicos covalentes. En el caso de agentes terapéuticos múltiples, se puede utilizar una combinación de varias conjugaciones. Algunos agentes

contienen un grupo funcional tal como un grupo alcohol, ácido, carbonilo, tiol o amina para ser utilizado en la conjugación con el péptido RAP.

En algunas realizaciones, un enlace químico covalente que puede ser directo (no hay átomos interpuestos) o indirecto (a través de un enlazador, por ejemplo, una cadena de átomos unidos covalentemente) une el péptido RAP y el agente inhibidor. En realizaciones preferidas, el péptido RAP y el resto del agente inhibidor del conjugado están unidos directamente por enlaces covalentes entre un átomo del péptido RAP y un átomo del agente inhibidor. En algunas realizaciones preferidas, el resto de unión al receptor está conectado con el resto del agente inhibidor del compuesto mediante un enlazador que comprende un enlace covalente o un péptido de virtualmente cualquier secuencia de aminoácidos o cualquier molécula o átomo capaces de conectar el péptido RAP con el agente inhibidor.

En algunas realizaciones, el enlazador comprende una cadena de átomos de 1 a aproximadamente 60, o 1 a 30 átomos o más larga, 2 a 5 átomos, 2 a 10 átomos, 5 a 10 átomos, o 10 a 20 átomos de longitud. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena son todos átomos de carbono. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena se seleccionan del grupo que consiste en C, O, N, y S. Los átomos de la cadena y los enlazadores se pueden seleccionar de acuerdo con su solubilidad esperada (hidrofilicidad) a fin de proporcionar un conjugado más soluble. En algunas realizaciones, el enlazador proporciona un grupo funcional que es sometido a un ataque enzimático en un lisosoma. En algunas realizaciones, el enlazador proporciona un grupo funcional que es sometido al ataque por una enzima que se encuentra en el tejido u órgano diana y que, después del ataque o hidrólisis corta la unión entre el agente inhibidor y el péptido RAP. En algunas realizaciones, el enlazador proporciona un grupo funcional que es sometido a hidrólisis en las condiciones encontradas en el sitio diana (por ejemplo, pH bajo de un lisosoma). Un enlazador puede contener uno o más de tales grupos funcionales. En algunas realizaciones, la longitud del enlazador es suficientemente larga para reducir el potencial de impedimento estérico (cuando un agente activo es grande) entre uno o ambos, el sitio de unión del péptido RAP y el sitio de unión del agente activo.

Si el enlazador es un enlace covalente o un péptido y el agente activo es un polipéptido, todo el conjugado puede ser una proteína de fusión. Dichos enlazadores peptídicos pueden ser de cualquier longitud. Ejemplos de enlazadores tienen de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, 5 a 50, o 10 a 30 aminoácidos de longitud. Dichas proteínas de fusión se pueden producir por métodos de ingeniería genética recombinante conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la porción de péptido RAP del conjugado se formula para degradarse rápidamente para liberar el compuesto activo. En otras realizaciones, el enlazador se somete a escisión en condiciones ambientales intracelulares, o más preferiblemente, lisosómicas, para liberar o separar la porción de agente activo de la porción de polipéptido de péptido RAP.

Los enlazadores peptídicos a modo de ejemplo incluyen cualquier dendrímero conocido en la técnica, tales como los dendrímeros de lisina, que incluyen pero no se limitan a, un dendrímero de lisina de 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a o 6^a generación, tal como un dendrímero de lisina K4K2K o un dendrímero de lisina KG6 (Okuda et al., J Controlled Release 116, 330-336, 2006). Otros dendrímeros incluyen dendrímeros PAMAM (poli(amidoamina)), dendrímeros POPAM (poliamino-propileno-amina), dendrímeros híbridos POPAM-PAMAM, dendrímeros de triazina. Véase, por ejemplo, Grayson and Frechet, Chem Rev. 101: 3819, 2001; Mintzer et al., New J Chem. 33: 1918-1925, 2009; Majoros et al., Macromolecules, 41: 8372-8379, 2008, y las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Nos. 20090287005, 20090240028 y 20090182151.

El conjugado puede comprender uno o más agentes inhibidores unidos al mismo péptido RAP o a múltiples péptidos RAP. Por ejemplo, las reacciones de conjugación pueden conjugar de aproximadamente 1 a 5, aproximadamente 1 a 10, aproximadamente 5 a 10, aproximadamente 10 a 20, aproximadamente 20 a 30, o 30 o más moléculas de un agente inhibidor con el péptido o péptidos RAP. En ciertas realizaciones, se contempla que el conjugado RAP comprende principalmente (por ejemplo, más de 50 %, 70 %, 80 %, o 90 %) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más moléculas de inhibidor por molécula de péptido RAP, por ejemplo, para una relación estequiométrica de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1. Otras relaciones estequiométricas de inhibidor de fucosidasa a péptido RAP incluyen 1:2, 1:3, 3:2, 5:2, 7:2, 9:2, 11:2, 4:3, 5:3, 7:3, 8:3, 10:3, 11:3. En algunas realizaciones, la relación de moléculas de inhibidor a moléculas de péptido RAP está entre 1:1 y 12:1, o entre 1,5:1 y 10:1. Estas formulaciones se pueden emplear como mezclas, o se pueden purificar en formulaciones estequiométricas específicas.

Los expertos en la técnica son capaces de determinar qué formato y qué relación estequiométrica se prefiere. Además, se puede unir más de un tipo de agente inhibidor al péptido RAP cuando se desea la administración de más de un tipo de agente a un sitio o compartimento diana. Una pluralidad de especies de agente inhibidor pueden ser unidas al mismo péptido RAP por ejemplo, DFJ-RAP Faz, u otros conjugados. Por lo tanto, los conjugados pueden consistir en una gama de relaciones estequiométricas y pueden incorporar más de un tipo de agente inhibidor. Estos, se pueden separar también en mezclas purificadas o se pueden emplear como agregados.

Los conjugados de péptidos RAP descritos aquí, se pueden modificar como se conoce en la técnica para mejorar su estabilidad o sus propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, PEGilación o unión con otros polímeros solubles en agua). Los ejemplos de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, monometoxi-PEG, poli(óxido de etileno) (PEO), dextrano, poli(N-vinilpirrolidona), ácidos grasos, un co-polímero de

óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), HPMA, FLEXIMAR™, y alcohol polivinílico, mono-(alcoxi C1-C10)-PEG, ariloxi-PEG, tresil-monometoxi-PEG, PEG-propionaldehído, bis-succinimidil-carbonato-PEG, celulosa, otros polímeros basados en carbohidratos, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

5 En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua es lineal (por ejemplo, alcoxi-PEG o PEG bifuncional), ramificado o brazos múltiples (por ejemplo, PEG bifurcado o PEG unido a un núcleo de polioliol), dendrítico, o con enlaces degradables. Por otra parte, la estructura interna de la molécula de polímero se puede organizar en una serie de diferentes patrones y se puede seleccionar del grupo que consiste en homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero de bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio, y tripolímero de bloque.

10 El término "PEGilado", como se usa aquí, se refiere a una proteína, conjugado de proteína o polipéptido unido a uno o más restos de PEG. El término "PEGilación" como se utiliza aquí, se refiere al proceso de unión de uno o más PEGs a una proteína. En una realización, el peso molecular de dicho PEG está en el intervalo de 3 a 100 kDa, de 5 a 60 kDa, de 5 a 40 kDa, de 5 a 25 kDa, de 5 a 15 kDa, o de 5 al 10 kDa.

15 Enlazadores adecuados y sus grupos funcionales y los métodos químicos de síntesis fácilmente adaptables para la preparación de los mismos, se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003253890.

Caracterización de los conjugados RAP

I. Marcadores

20 En algunas realizaciones, el conjugado basado en péptido RAP está marcado para facilitar su detección. Un "marcador" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, químicos, u otros medios físicos.

25 Como se ha indicado anteriormente, dependiendo del ensayo de cribado empleado, se pueden marcar el agente activo, el enlazador o la parte de péptido RAP de un conjugado. El marcador o grupo detectable particular utilizado no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la actividad biológica del conjugado. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Por lo tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

30 Los ejemplos de marcadores adecuados para su uso incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), reactivos de densidad electrónica, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otras comúnmente utilizadas en un ensayo ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). La biotina, digoxigenina o haptenos y otras proteínas se pueden hacer detectables, por ejemplo, incorporando un marcador en el hapteno o péptido.

35 El marcador se puede acoplar directa o indirectamente al componente deseado del ensayo según métodos bien conocidos en la técnica. El marcador en una realización se une covalentemente al biopolímero utilizando un reactivo de isocianato para conjugar un agente activo como se describe en esta memoria. Los reactivos bifuncionales de isocianato descritos aquí se pueden usar para conjugar un marcador con un biopolímero para formar un conjugado de biopolímero con marcador sin un agente activo unido al mismo. El conjugado de biopolímero con marcador se puede utilizar como un intermedio para la síntesis de un conjugado marcado como se describe en esta memoria o se puede utilizar para detectar el conjugado de biopolímero. Como se ha indicado antes, se pueden utilizar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación con el componente del ensayo deseado, de los requisitos de estabilidad, de la instrumentación disponible, y de los recursos de eliminación. Los marcadores no radiactivos se unen a menudo por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando se une a otra molécula (por ejemplo, estreptavidina), que o bien es inherentemente detectable o está unida covalentemente a un sistema señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente.

45 Los conjugados se pueden conjugar también directamente a compuestos generadores de señales, por ejemplo, mediante conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas adecuadas para su uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, hidrolasas, particularmente fosfatasa, esterasas y glucosidasas, u oxidasas, particularmente peroxidasa. Los compuestos fluorescentes, esto es, fluoróforos, adecuados para uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Otros ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero no se limitan a, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo de acridina, lisamina rodamina, eritrosina B sulfonil-cloruro, rutenio (tris, bipyridinio), rojo Texas, dinucleótido de nicotinamida adenina, dinucleótido de flavina adenina, etc. Los compuestos quimioluminiscentes adecuados para uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, luciferina y 2,3-dihidroftalazindionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de los diversos sistemas para producir marcas o señales que se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente memoria, véase la patente de Estados Unidos N° 4.391.904.

Los medios de detección de marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar excitando el fluorocromo con la longitud de onda apropiada de la luz y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados de carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Del mismo modo, los marcadores enzimáticos se pueden detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Otros sistemas de marcaje y detección adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente memoria serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Dichos moduladores y ligandos marcados se pueden utilizar en el diagnóstico de una enfermedad o condición de salud.

Receptor LRP1 de RAP

LRP1 (proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad) es un miembro de la familia "LDLR" de receptores de lipoproteína de baja densidad. La LRP1 es una proteína grande de 4525 aminoácidos (600 kDa), que es escindida por la furina para producir dos subunidades de 515 kD (alfa) y 85 kDa (β) que permanecen unidas no covalentemente. La LRP se expresa en la mayor parte de los tipos de tejidos, pero se encuentra principalmente en el hígado. Otros miembros de la familia de receptores de lipoproteína de baja densidad (LDL) incluyen LDL-R (132 kDa); LRP2 (megalina, gp330); LRP/LRP1 y LRP1B (600 kDa); VLDL-R (130 kDa); LRP5; LRP6; apoER-2 (LRP-8, 130 kDa); LDL-R Mosaico (LR11, 250 kDa); y otros miembros tales como LRP3, LRP6 y LRP-7. Los rasgos característicos de la familia incluyen la expresión en la superficie celular; repeticiones extracelulares de dominio de unión a ligando (DxSDE); necesidad de Ca^{++} para la unión al ligando; unión de RAP y apoE; repeticiones del dominio de homología del precursor EGF (YWTD); una región que abarca una sola membrana; señales de internalización en el dominio citoplásmico (FDNPXY); y endocitosis de diversos ligandos mediada por receptores. Algunos miembros de la familia, incluyendo LRP1, participan en las rutas de transducción de señales. En algunas realizaciones, los conjugados de péptido RAP de la invención se unen preferiblemente a LRP1 en comparación con otros miembros de la familia LDL-R, por ejemplo, con una afinidad 1,5, 2, 3, 4, 5, 10 veces o más alta para LRP1.

LRP1 tiene el N° de acceso de GenBank X13916 y el N° de acceso de SwissProt Primary Q07954. Los nombres alternativos para el gen/proteína LRP1 incluyen: proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad [precursora], LRP, receptor de alfa-2-macroglobulina, A2MR, receptor de apolipoproteína E, ApoER, CD91, LRP1 o A2MR. La LRP1 expresada en el hígado y en el tejido muscular liso vascular puede producir la endocitosis del ligando en estos tejidos.

Inhibidores de alfa-L-fucosidasa y fucosidasa

La enzima alfa-L-fucosidasa (N° de acceso de GenBank NP_000138) normalmente participa en la escisión de las cadenas largas de azúcar (oligosacáridos) en el lisosoma. Cuando falta la enzima, las cadenas de azúcar se acumulan y eventualmente dan lugar a las características clínicas de la fucosidosis. La fucosidosis es una enfermedad por almacenamiento lisosómico, recesiva autosómica, causada por alfa-L-fucosidasa defectuosa con acumulación del azúcar fucosa en los tejidos. Véase, por ejemplo, Johnson et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 90-7, 1986. Diferentes fenotipos incluyen características clínicas tales como deterioro neurológico, retraso del crecimiento, visceromegalia y convulsiones en una forma precoz severa; rasgos faciales toscos, angioqueratoma corporal difuso, espasticidad y retraso del desarrollo psicomotor en una forma de mayor supervivencia.

La fucosidosis se puede detectar utilizando ensayos genéticos para identificar una mutación en el gen de la fucosidasa. La fucosidasa se diagnostica también por la presencia de niveles aumentados de proteínas fucosiladas en la orina de pacientes con fucosidosis (Michalski et al, *Eur J Biochem* 201:.. 439-58, 1991).

La alfa-L-fucosidasa se ha detectado en niveles aumentados en el carcinoma hepatocelular y se ha sugerido que es un marcador del HCC (Giardina et al, *Cancer* 70:.. 1044-48, 1992).

Muchos inhibidores de la fucosidasa son moléculas pequeñas que interfieren con la actividad enzimática de la hidrólisis por la fucosidasa de los enlaces de hidratos de carbono. Algunos inhibidores de fucosidasa se basan en la estructura de los imino azúcares de nojirimicina (Véase la patente de Estados Unidos N°. 5.100.797.), que son alcaloides imitadores de azúcar que inhiben las glucosidasas debido a su parecido estructural con el resto de azúcar del sustrato natural. Los iminoazúcares son similares a los inhibidores de glucosidasas bacterianas. Para preparar los compuestos iminoazúcares, el anillo de monosacáridos que contiene oxígeno se reemplaza por un anillo que contiene nitrógeno (pirrolidina, piperidina) llevando a un iminoazúcar que actúa como un glucomimético.

La L-desoxifuconojirimicina (DFJ) es un inhibidor potente, específico y competitivo (en el intervalo de 10 nM) de la alfa-L-fucosidasa del hígado humano. Se ha demostrado que análogos estructurales de la desoxifuconojirimicina que conservan la configuración de los grupos hidroxilo en los átomos de carbono 2, 3 y 4 del anillo de piperidina conservan la actividad inhibitoria de la fucosidasa. Por ejemplo, diferentes sustituyentes en cualquier configuración en el átomo de carbono 1 (esto es, 1-alfa y 1-beta-homofuconojirimicinas) y en el átomo de carbono 5 pueden alterar la potencia, pero no destruir la actividad. Véase Winchester et al., *Biochem. J.* 265: 277-282, 1990.

5 Otros inhibidores de fucosidasa son los azaazúcares, tales como los azepanos de siete miembros, que son compuestos que contienen anillo con nitrógeno que imitan la estructura de los hidratos de carbono y que son potentes inhibidores de la función de glucosidasa [12]. A pesar de tener la configuración de hidroxilo y la funcionalidad carboxilo de un azúcar iduronato, estas nuevas moléculas inhiben también la fucosidasa con una potencia en el intervalo nanomolar bajo [12]. Como la mayor parte de los inhibidores de iminoazúcares, no se espera que la modificación alquílica de la amina tenga un efecto inhibidor significativo de la potencia [13; 14], lo que permite la conjugación fácil y estable del inhibidor con biopolímeros grandes, tales como los péptidos. Otros inhibidores más de la fucosidasa son ciclopentilaminas sustituidas (patente de Estados Unidos N° 5.382.709).

10 Los ejemplos de inhibidores de la fucosidasa, incluyen L-desoxifuconojirimicina (DFJ), beta-L-homofuconojirimicina y 1-beta-C-desoximanojirimicinas sustituidas (beta-1-C-metil-desoximanojirimicina, beta-1-C-etil-desoximanojirimicina, beta-1-C-fenil desoximanojirimicina), y un azepano de siete miembros, ácido (3R,4R,5S,6S)-1-butil-4,5,6-trihidroxiazepano-3-carboxílico ("Faz") Inhibidores adicionales de la fucosidasa contemplados para uso en la invención incluyen (1-alfa,2-beta,3-alfa o beta,4-alfa,5-alfa o beta)-2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)ciclopentilaminas sustituidas y 2,6-imino-2,6,7-tridesoxi-D-glicero-D-gluco-heptitol.

15 Los inhibidores de la fucosidasa que retienen la actividad, esto es, la capacidad para inhibir la alfa-L-fucosidasa *in vitro*, en el intervalo de 1 pM-100 nM, o intervalo 1-100 nM, se revelan para su uso en los conjugados como se describen en la presente memoria.

Composiciones farmacéuticas y su administración

20 Los conjugados se pueden formular en preparaciones para inyección mediante disolución, suspensión o emulsión de los mismos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

25 Los conjugados se pueden utilizar en formulación en aerosol para ser administrada por inhalación. Los compuestos descritos aquí se pueden formular en propelentes presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Las formas farmacéuticas unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el conjugado en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal estéril u otro vehículo farmacéuticamente aceptable estéril.

30 En la práctica, el conjugado de péptido RAP descrito en esta memoria se puede combinar como el ingrediente activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico según las técnicas convencionales de preparación de compuestos farmacéuticos. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa),.

35 Con respecto a las vías de administración transdérmicas, los métodos para la administración transdérmica de fármacos están descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, (Gennaro et al. Eds. Mack Publishing Co., 1985). Los parches dérmicos o de la piel son un medio para la administración transdérmica de los conjugados de la invención. Los parches proporcionan preferiblemente un potenciador de la absorción tal como DMSO para aumentar la absorción de los compuestos. Otros métodos para la administración transdérmica de fármacos están descritos en las patentes de Estados Unidos Números 5.962.012, 6.261.595 y 6.261.595.

40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están comercialmente disponibles. Además, están comercialmente disponibles sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes para ajuste del pH y agentes tampón, agentes para ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares.

45 Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, de la gravedad de los síntomas y de la predisposición del sujeto a los efectos secundarios. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica mediante una variedad de medios, incluyendo, pero sin limitarse a evaluaciones de respuesta a la dosis y evaluaciones farmacocinéticas realizadas en pacientes, animales de ensayo, e *in vitro*.

50 Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, e intravenosa), pulmonar (inhalación nasal o bucal), o administración nasal, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá en parte de la naturaleza y gravedad de las afecciones a tratar y de la naturaleza del ingrediente activo. Ejemplos de vías de administración son las vías oral e intravenosa. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

55 Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar encapsuladas en o unidas a envolturas virales o vesículas, o incorporadas a las células. Las vesículas son partículas micelares que normalmente son

esféricas y que con frecuencia son lipídicas. Los liposomas son vesículas formadas a partir de una membrana bicapa. Las vesículas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, vesículas unilamelares y vesículas lipídicas multilamelares o liposomas. Dichas vesículas y liposomas se pueden preparar a partir de una amplia gama de compuestos de lípidos o fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélin, glucolípidos, gangliósidos, etc., utilizando técnicas estándar, tales como las descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 4.394.448. Tales vesículas o liposomas se pueden utilizar para administrar compuestos intracelularmente y para administrar compuestos a los órganos diana. La liberación controlada de una composición de interés se puede conseguir también utilizando la encapsulación (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5,186,941).

Se puede utilizar cualquier vía de administración que administre el conjugado de péptido RAP al torrente sanguíneo. Preferiblemente, la composición se administra por vía parenteral, lo más preferiblemente por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra a través de la vena porta. También son útiles las inyecciones intrayugulares e intracarotídeas. Las composiciones se pueden administrar localmente o regionalmente, tal como intraperitonealmente o subcutáneamente o intramuscularmente. Las composiciones se pueden administrar con un diluyente o vehículo farmacéutico adecuado.

Las dosis a administrar dependerán de las necesidades individuales, del efecto deseado, del agente activo utilizado, del biopolímero y de la vía de administración elegida. Las dosis preferidas de un conjugado varían desde aproximadamente 0,2 pmol/kg hasta aproximadamente 25 nmol/kg, y las dosis particularmente preferidas varían de 2-250 pmol/kg; alternativamente, las dosis preferidas del conjugado puede estar en el intervalo de 0,02 a 2000 mg/kg o 0,1 a 100 mg/kg. Estas dosis se verán influenciadas por el número de restos de inhibidor asociados con el conjugado RAP. Alternativamente, se pueden calcular las dosis en base a los moles de agente inhibidor administrados.

Los expertos en la técnica pueden determinar las dosis adecuadas para los compuestos unidos a un péptido RAP basándose en parte en la dosis recomendada utilizada para la forma libre del agente activo conjugado.

Los conjugados y moduladores descritos aquí son útiles para la intervención terapéutica, profiláctica y de diagnóstico en los animales, por ejemplo mamíferos, y en particular en los seres humanos.

Los presentes métodos encuentran uso en el tratamiento de una variedad de diferentes enfermedades. Es de particular interés el uso de los presentes métodos en enfermedades, en las que se identifica un beneficio de un inhibidor de la fucosidasa, pero en las que el inhibidor no se administra de manera adecuada al sitio, área o compartimento diana para producir un resultado terapéutico plenamente satisfactorio. Los presentes métodos para conjugar el agente inhibidor con un péptido RAP se utilizan para mejorar la eficacia terapéutica y el índice terapéutico del inhibidor de la fucosidasa.

Las enfermedades específicas que se pueden tratar con los presentes conjugados son variadas. Por lo tanto, las enfermedades que afectan al hígado y que se pueden tratar por los métodos descritos en esta memoria incluyen enfermedades celulares proliferativas, tales como enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades de anormalidad hormonal, enfermedades degenerativas, enfermedades del envejecimiento, y similares, que pueden producir el crecimiento de tumores hepáticos.

El tratamiento significa englobar cualquier resultado beneficioso para un sujeto asociado con la administración de un conjugado que incluye una menor probabilidad de adquirir una enfermedad, la prevención de una enfermedad, la ralentización, detención o inversión del progreso de una enfermedad o una mejoría de los síntomas asociados con la enfermedad que padece el hospedante, donde la mejoría o el beneficio se utilizan en un sentido amplio para referirse al menos a una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, un síntoma, asociado con la afección patológica a tratar, tal como la inflamación y el dolor asociado con la misma. Como tal, el tratamiento incluye también situaciones en las que la afección patológica, o al menos los síntomas asociados con la misma, se inhiben completamente, por ejemplo, se evita que aparezcan, o se detienen, por ejemplo, se terminan de tal modo que el hospedante ya no sufre la condición patológica, o al menos los síntomas que caracterizan la condición patológica.

Administración de conjugados de péptido RAP al hígado

La mayor parte del hígado está perfundida principalmente por la vena porta. La dependencia del tumor de la sangre arterial, junto con la eficacia de la captura de primer paso, debería permitir preservar una porción significativa de tejido hepático no canceroso después de la administración intravenosa de conjugados RAP-.

Además de las ventajas potenciales que ofrece la vasculatura hepática, los niveles relativos de expresión de LRP1 sobre las células tumorales de HCC y el tejido circundante favorecen además la eficacia de los conjugados RAP. Los estudios han demostrado al menos una mejoría de diez veces de la expresión de LRP1 en los hepatocitos después de la transformación neoplásica (Laitthwaite et al., *Toxicol* 39, 1283-1290, 2001). En marcado contraste, otros han demostrado que la LRP1 está significativamente subexpresada en tejido hepático no canceroso, pero cirrótico, (Hollestelle et al., *Thromb Haemost* 91, 267-275, 2004). El aumento de la expresión de LRP1 en las células tumorales, con disminución de la expresión en cualquier lugar del hígado enfermo, al igual que la administración

arterial con la captura de primer paso, debería dar como resultado una administración no uniforme de los conjugados RAP, con una preferencia por el tejido tumoral. La administración no uniforme, junto con el aumento en general de la sensibilidad de las células tumorales, que proliferan rápidamente, para los agentes quimioterapéuticos, puede salvar la barrera para el tratamiento presentada por la disminución de la reserva del hígado en la mayoría de los pacientes con HCC.

El RAP demuestra una rápida difusión en el hígado después de la administración. Después de la inyección intravenosa en embolada de 30 picomoles de proteína, más del 70 % del RAP exógeno se acumula en el hígado antes de 10 minutos (Warshawsky et al, J Clin Invest 92: 937-944, 1993). La semivida circulante de RAP inyectado es inferior a un minuto. Estos resultados farmacocinéticos se observan también en inyecciones intravenosas de hasta 2,5 mg/kg (60 nmol/kg) en ratas (Warshawsky et al., supra). Resultados farmacocinéticos similares han sido descritos para otro ligando de LRP1 de alta afinidad, α -2-macroglobulina activada por la proteasa, una glucoproteína sérica tetramérica de 725 kD (Davidsen et al, Biochim Biophys Acta 846: 85-92, 1985). Sólo una pequeña cantidad de RAP (<1 % de la dosis inyectada) se acumula en el corazón, cerebro, músculo o riñón, lo que indica que tanto la expresión tisular como la vascular de LDLR que se une a RAP en estos tejidos es insignificante para esta aplicación. El RAP administrado por vía intravenosa, ha mostrado una toxicidad no medible en especies de roedores y felinos. La eficiencia de captura de RAP por el hígado se ve reforzada por una etapa inicial de unión de baja afinidad al abundante proteoglicano de sulfato de heparina en la superficie celular sobre los hepatocitos, con la unión posterior de alta afinidad y la endocitosis por LRP1 (Herz et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 92: 4611-4615, 1995; Mahley et al, J Lipid Res. 40: 1-16, 1999).

Aunque una serie de factores favorecen la dirección selectiva hacia el tumor hepático por los conjugados de RAP, también se da a entender que dichos agentes serán eficaces sobre la HCC con metástasis. Las células tumorales de metástasis tienden a retener sus características después de la migración a los sitios heterotópicos, lo que demuestra que no disminuye la expresión de LRP1 en el HCC humano con metástasis extrahepática (Gao et al, World J Gastroenterol. 10: 3107-3111, 2004). Este factor puede volver al HCC con metástasis igualmente susceptible a los conjugados de péptido RAP que comprenden inhibidores de fucosidasa, administrados por vía intravenosa.

Trastornos hepáticos

La presente descripción contempla la conjugación de inhibidores de fucosidasa con péptidos RAP y la administración de dichos conjugados.

Las enfermedades hepáticas o trastornos hepáticos contemplados por la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, aquellos trastornos que se exponen a continuación. El carcinoma hepatocelular o hepatoma, es el quinto cáncer más común en el mundo y las tasas de incidencia están subiendo de manera constante. Los hepatocitos tumorígenos conservan altos niveles de expresión de LRP1. El carcinoma hepatocelular no responde bien a la quimioterapia debido a que las células tumorales muestran altas tasas de resistencia a los fármacos y porque las quimioterapias utilizadas tienen toxicidades graves, especialmente para el corazón y el riñón, debido a la administración sistémica (intravenosa).

Hepatitis es un término genérico para la inflamación del hígado. La hepatitis puede ser aguda o crónica e incluye insuficiencia hepática aguda o crónica, por ejemplo, debido a infecciones de virus (por ejemplo, hepatitis A, B, C, D o E o no ABCDE, CMV, virus de Epstein-Barr), infecciones de hongos, rickettsias o parasitarias, al alcohol, toxinas químicas, fármacos (por ejemplo, acetaminofeno, amiodarona, isoniazida, halotano, clorpromazina, eritromicina), enfermedad metabólica hepática (por ejemplo, la enfermedad de Wilson, la deficiencia de alfa1-antitripsina), cáncer, enfermedad hepática autoinmune idiopática, cirrosis (por ejemplo, cirrosis biliar primaria), obstrucción biliar. La infección del hígado por el virus de la hepatitis A, B y/o C puede llevar al progreso lento de la enfermedad hepática que conduce a la insuficiencia hepática. La infección de hepatitis aguda es causada muy comúnmente por la hepatitis A. Tanto la infección de hepatitis B como de hepatitis C pueden persistir en el cuerpo y llegar a ser infecciones de larga duración (crónicas). La hepatitis C puede causar condiciones críticas incluyendo cirrosis y cáncer.

Los trastornos o afecciones hepáticas adicionales contempladas que se pueden tratar utilizando inhibidores de fucosidasa conjugados con péptidos RAP incluyen tumores asociados con o resultantes de esteatitis hepática, colestasis, cirrosis hepática, daño hepático tóxico (por ejemplo, debido a la toxicidad de fármacos o toxicidad ambiental, tal como el cáncer asociado a Aflatoxina B1) y la hemocromatosis hereditaria.

Se contempla que la administración del conjugado de péptido RAP- inhibidor de fucosidasa a sujetos que tienen un tumor en el hígado se hace en combinación con un segundo agente, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, los agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, radioisótopos, antivirales, antifúngicos, anti-inflamatorios, anticuerpos y otras terapias útiles para el tratamiento de tumores hepáticos u otras enfermedades hepáticas asociadas con el desarrollo de tumores en el hígado.

Los fármacos candidatos para la administración a pacientes con HCC en combinación con los conjugados de péptidos RAP para el tratamiento de carcinoma de hígado incluyen, pero no se limitan a: 5-fluorouracilo, doxorubicina (adriamicina), mitomicina C, cisplatino, epirubicina, daunorubicina, etopósido y otros agentes

quimioterapéuticos indicados en la Tabla 1, adefovir, lamivudina, entecavir, ribavirina, interferón alfa, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2b y otros antivirales, vitamina E, ácido ursodesoxicólico, y otros agentes utilizados para tratar trastornos hepáticos. En la Tabla 1 se muestran agentes adicionales.

Tabla 1

Agentes alquilantes	Productos naturales
Mostazas nitrogenadas	Fármacos antimicóticos
mecloretamina	
ciclofosfamida	
ifosfamida	Taxanos
melfalán	paclitaxel
clorambucilo	alcaloides de la Vinca
	vinblastina (VLB)
Nitrosoureas	vincristina
carmustina (BCNU)	vinorelbina
lomustina (CCNU)	Taxotere® (docetaxel)
semustina (metil-CCNU)	estramustina
	fosfato de estramustina
Etilenimina/Metil-melamina	
trietilencelamina (TEM)	Epipodofilotoxinas
trietilencel tiosforamida	etopósido
(tiotepa)	teniposida
hexametilmelamina	
(HMM, altretamina)	Antibióticos
	actinomomicina D
Sulfonatos de alquilo	daunomicina (rubido-micina)
busulfán	doxorubicina (adria-micina)
	mitoxantroneidarubicina
Triazinas	bleomicina
dacarbazina (DTIC)	esplicamicina (mitramicina)
	mitomicinaC
Antimetabolitos	dactinomomicina
Análogos de ácido fólico	afidicolina
metotrexato	
trimetrexato	Enzimas
Pemetrexed	L-asparaginasa
(antifolato multi-dirigido)	L-arginasa
Análogos de pirimidina	Radiosensibilizadores
5-fluorouracilo	metronidazol
fluorodesoxiuridina	misonidazol
gemcitabina	desmetilmisonidazol
arabinósido de citosina	pimonidazol
(AraC, citarabina)	etanidazol
5-azacitidina	nimorazol
2,2'-difluorodesoxi-citidina	RSU 1069
	EO9
Análogos de purina	RB 6145
6-mercaptopurina	SR4233
6-tioguanina	nicotinamida
azatioprina	5-bromodesoxiuridina
2'-desoxicoformicina	5-yododesoxiuridina
(pentostatina)	bromodesoxicidina
eritrohidroxinonil-adenina (EHNA)	
fosfato de fludarabina	Agentes diversos
2-clorodeoxiadenosina	Complejos de coordinación de platino
(cladribina, 2-CdA)	cisplatino
	carboplatino
Inhibidores de la topoisomerasa tipo I	oxaliplatino
camptotecina	Antracenediona
topotecan	mitoxantrona
irinotecán	
	Urea sustituida
Modificadores de la respuesta biológica	hidroxiurea

G-CSF GM-CSF	Derivados de metilhidrazina N-metilhidrazina (MIH) procarbazina
Agentes de diferenciación derivados de ácido retinoico	
Hormonas y antagonistas Adrenocorticosteroides/antagonistas prednisona y equivalentes dexametasona ainoglutetimida	Supresor adrenocortical mitotano (o, P ¹ - DDD) ainoglutetimida
Progesterinas caproato de hidroxiprogesterona acetato de medroxiprogesterona acetato de megestrol	Citocinas interferón (α, β, γ) interleucina-2
Estrógenos dietilestilbestrol etinil estradiol/equivalentes	Fotosensibilizadores derivados de hematoporfirina Photofrin ® derivados de benzoporfirina Npe6 etioporfirina de estaño (SnET2) feoboride-a bacterioclorofila-a naftalocianinas ftalocianinas ftalocianinas de zinc
Antiestrógenos tamoxifeno	
Andrógenos propionato de testosterona fluoximesterona/equivalentes	Radiación rayos X luz ultravioleta radiación gamma luz visible radiación infrarroja radiación de microondas
Antiandrógenos flutamida liberador de gonadotropina análogos de hormonas leuprolide	
Antiandrógenos no esteroideos flutamida	

Los agentes citotóxicos útiles para tratar tumores incluyen, pero no se limitan a hidroclicloruro de mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, melfalán, busulfán, tiotepa, carmustina, lomustina, dacarbazina y estreptozocina

- 5 Los radioisótopos útiles para tratar tumores incluyen, pero no se limitan a ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ¹²⁷Lu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²⁵⁵Fm, ¹⁴⁹Tb, ²²³Rd, ²¹³Pb, ²¹²Pb, ²¹¹At, ⁸⁹Sr, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ²²⁵Ac, ¹⁸⁶Re, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga y ^{99m}Tc.

- 10 Los anticuerpos contemplados para uso en los métodos incluyen los utilizados para tratar el cáncer de hígado y otros trastornos hepáticos, incluyendo, pero sin limitarse a, receptor del factor de crecimiento anti-epidérmico (EGFR) (cituximab, panitumamab), receptor alfa del factor de crecimiento derivado de anti-plaquetas (PDGFRalfa), anti-glicoproteína 3 (GPC3), y otros anticuerpos útiles para tratar el cáncer de hígado o el cáncer con metástasis en el hígado.

Kits

- 15 La presente descripción incluye kits que comprenden uno o más conjugados o composiciones descritas en esta memoria envasados de una manera que facilite su uso para practicar los métodos descritos aquí. En un ejemplo, dicho kit incluye un conjugado o composición descrita en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende el conjugado de péptido RAP-inhibidor de fucosidasa solo o en combinación con un segundo agente), envasado en un recipiente tal como un frasco o vaso sellado con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el paquete que describe el uso del conjugado o de la composición en la práctica del método. Preferiblemente, el conjugado o la composición se envasa en una forma farmacéutica unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para la administración de la composición según una vía específica de administración. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición del conjugado de péptido RAP.

Aspectos y detalles adicionales de la invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que se pretende que sean ilustrativos y no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción y caracterización de los conjugados de péptido RAP-inhibidor de fucosidasa

Métodos

5 Fabricación de conjugados de péptidos: Han sido publicadas previamente [11; 12] rutas sintéticas para desarrollar ambos inhibidores de la fucosidasa. La identificación y fabricación de péptidos RAP se han descrito anteriormente [15; 16]. Para unir ocho moléculas de inhibidor de fucosidasa a una molécula de péptido RAP, el N-terminal del péptido se modifica con un dendrímero de lisina K4K2K. La etapa final en la preparación del conjugado es la formación del enlace peptídico entre cada uno de los ocho dendrímeros de aminas primarias y ocho moléculas de los inhibidores de fucosidasa que contienen el enlazador de carboxilato (ya sea N-5-carboxipentil-desoxifuconojirimicina o N-5-carboxipentil-Faz).

10 Eficacia bioquímica en las células HepG2: Las células HepG2, originalmente derivadas de un tumor HCC, producen glucoproteínas hiperfucosiladas y RAP de endocitosis a través de LRP1 para el lisosoma. Para evaluar la eficacia bioquímica del conjugado de péptido RAP-inhibidor en los hepatocitos, se cultivan células HepG2 utilizando condiciones estándar y se incuban en placas de múltiples pocillos con tampón solo, inhibidores de fucosidasa, SEQ ID NO: 2 sola o conjugados que comprenden la SEQ ID NO: 2 e inhibidores de la fucosidasa. Se añade RAP de longitud completa a concentración 1 μM en algunos pocillos para bloquear la captación de la SEQ ID NO: 2 o los conjugados de péptidos RAP. Después de incubación durante la noche, se lavan las células con PBS frío y se lisan mediante congelación-descongelación en citrato de sodio 50 mM pH 4,8. Los lisados celulares se clarifican por centrifugación y la actividad de la fucosidasa se ensaya utilizando el ensayo de 4-metilumbeliferil-alfa-L-fucosa (disponible de Sigma-Aldrich, referencia PMID 2137330) según el protocolo del fabricante. Se analizan también los niveles de β -glucuronidasa utilizando procedimientos estándar para normalizar al número de células y la función lisosómica.

15 Estudios de eficacia funcional en células HepG2: Se siembran células HepG2 a 1×10^5 células por pocillo en placas de 12 pocillos y se dejan recuperar durante 24 horas. Se incuban entonces las células con inhibidores de la fucosidasa, conjugados de péptidos RAP o péptido RAP solo durante 72 horas. Se evalúa después el estado de las células por el ensayo de proliferación MTT.

20 Es de esperar que la inhibición de la actividad de fucosidasa en las células HepG2 produzca un aumento de las proteínas fucosiladas en las células, lo que lleva a la muerte celular o al menos a una desaceleración o detención de la proliferación celular.

25 Importancia de la reducción de fucosidasa FUCA1 en líneas normales y líneas de HCC-siRNA (RNA de interferencia pequeño). Una variedad de células hepatocitos humanos primarios (Lonza, Basel, Switzerland) y líneas de carcinoma hepatocelular humano (comercialmente disponibles, MDS Pharma, Hep3B, HepG2, HLE, HLF, HuCCT1, HUH-6 Clone 5, PLC/PRF/5, SNU-423) se siembran en placas en medios apropiados y se transfectan con un conjunto de FUCA1 dirigido a los siRNAs (Invitrogen, Calsbad, CA.). Las células se incuban entonces durante 72 horas y se someten a un mecanismo de multiplexado de ensayo de acción de alto contenido (MOA-HCA). Las células se ensayan en cuanto a la proliferación mediante la evaluación de la fluorescencia DAPI total en el núcleo y en cuanto a la apoptosis utilizando un ensayo de anti-caspasa 3 activada (Véase, por ejemplo, "A High-Content Analysis Assay and a Full-Automation Design Soley Using Noncontact Liquid Dispensing," Rodriguez, et al. Journal of The Association for Laboratory Automation, 2007). Todas las transferencias de fluidos se realizan en un Biomek FX (Beckman Coulter). Se adquieren imágenes TIFF de doce bits utilizando un analizador Incell 1000 3.2 y se cuantifican con el software Developer Toolbox 1.6. Se calculan los valores de EC50 utilizando regresión no lineal con un modelo de dosis-respuesta de un sitio de cuatro parámetros, sigmoidal de cuatro puntos. Se realizan el ajuste de la curva y los cálculos utilizando el software basado en MathIQ (AIM). Se calculan los valores de número de células como recuento celular relativo (pocillos de ensayo)/recuento celular relativo (pocillos de vehículo) $\times 100$. La EC50 del recuento celular relativo se mide como la concentración del compuesto de ensayo que produjo la mitad de la respuesta máxima eficaz. Se utiliza la caspasa-3 activada para cuantificar las células en las etapas de inicio a fin de la apoptosis. La salida para este ensayo es un aumento proporcional de las células apoptóticas en los pocillos de ensayo sobre la de los pocillos con vehículo, normalizados al recuento de células relativo en cada pocillo. Las concentraciones de la sustancia de ensayo que causan un aumento de cinco veces en la señal de la caspasa-3 indican una inducción significativa de la apoptosis.

30 Es de esperar que la inhibición de la actividad de fucosidasa mediante la administración de FUCA1 siRNA causará un aumento de las proteínas fucosiladas en las células, llevando a la muerte celular y al aumento de la actividad de caspasa-3 en las muestras cultivadas con el inhibidor de fucosidasa.

35 Importancia de la reducción de fucosidasa en líneas normales y líneas HCC-DNJ: Una variedad de hepatocitos humanos primarios (comercialmente disponible, Lonza) y líneas de carcinoma hepatocelular humano (comercialmente disponibles, MDS Pharma, Hep3B, HepG2, HLE, HLF, HuCCT1, HUH- 6 Clon 5, PLC/PRF/5, SNU-423) se siembran en placas en medios apropiados. Se incuban las células durante 72 horas en

desoxifuconojirimicina 10 mM y se someten a un mecanismo multiplexado de ensayo de acción de alto contenido (MOA-HCA) como se ha descrito antes.

5 Eficacia funcional en un modelo de xenoinjerto de tumor ortotópico: La eficacia del péptido RAP conjugado con inhibidor de fucosidasa se ensaya en un modelo de xenoinjerto intrahepático ortotópico como se ha descrito previamente [18; 19]. En resumen, se anestesian ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) de 6-8 semanas, con un anestésico apropiado, por ejemplo, ketamina, diazepam o una combinación de los mismos, y se realiza una laparotomía en la línea media superior para exponer la vena porta del ratón a través de una incisión en la línea media del abdomen. Se inyecta entonces una suspensión de 10^6 células HepG2 en la vena porta durante un minuto utilizando una aguja de calibre 30. Se cierra después la incisión con sutura y se mantienen los animales calientes hasta que estén completamente despiertos.

10 Para medir la eficacia del tratamiento con péptido RAP-inhibidor de fucosidasa, se lleva a cabo [18] una tomografía por emisión de positrones (PET) utilizando un agente radiomarcado apropiado, tal como 2-desoxi-2-(F-18)-fluoro-D-glucosa (^{18}F -FDG), para seguir la progresión del tumor inducida por HepG2 en los ratones tratados y en los ratones control mediante un método no invasivo. La eficacia del tratamiento con péptido RAP-inhibidor de fucosidasa se mide también *in vivo* mediante análisis histológico de la zona del tumor en los animales tratados y en los animales control.

La medida de indicadores de enfermedades de almacenamiento lisosómico, incluyendo los niveles de glucosaminoglicanos (GAG) en el lisosoma, orina y sangre, se ensayan también en el modelo de tumor ortotópico.

20 Es de esperar que la administración del conjugado péptido RAP-inhibidor de fucosidasa disminuirá el tamaño del tumor o hará más lenta la progresión del crecimiento del tumor en comparación con los sujetos que no recibieron el inhibidor de fucosidasa. Es de esperar también que la administración del conjugado de péptido-inhibidor aumentará el nivel de proteínas fucosiladas en los lisosomas de las células que absorben el inhibidor a través del receptor del péptido, tal como se mide por los ensayos GAG.

Ejemplo 2

25 La administración de inhibidor de fucosidasa a células HepG2 inhibe la fucosidasa lisosómica

Con el fin de determinar los efectos del propio inhibidor de la fucosidasa sobre las células hepáticas, se llevó a cabo un ensayo *in vitro*.

30 Se sembraron células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos a 4×10^5 por pocillo. Se alimentaron las células a las 24 horas con medio fresco y se trataron durante 72 horas por duplicado, o con desoxifuconojirimicina 30 μM (DNJ) o con tampón. Se lavaron después las células con PBS frío, se pasaron a un tubo de microcentrífuga, se sedimentaron y se lisaron. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el ensayo de Bradford para cada muestra y los volúmenes de lisado, se ajustaron a 0,3 mg/mL. Se midió la actividad de fucosidasa en 20 μL de cada muestra de lisado añadiendo 100 μL de 4-MU-fucopiranosido 0,5 mM con posterior incubación a 37 °C durante 30 minutos. Se inactivaron las reacciones con 130 μL de citrato 600 mM/tampón de carbonato a pH 9. Se ensayó el 4-MU liberado en un lector de microplacas de fluorescencia (véase el Ejemplo 1 anterior). Los resultados se ilustran en la Figura 4. Se calcularon las medias de los valores de actividad de muestras duplicadas y se representaron gráficamente.

35 Estos resultados muestran que un inhibidor de fucosidasa (desoxifuconojirimicina no conjugada) inhibe la fucosidasa lisosómica en > 50 % en una línea de carcinoma hepatocelular humano, y sugiere que un inhibidor de fucosidasa conjugado con RAP es eficaz para el tratamiento del cáncer hepático.

Ejemplo 3

Administración de conjugados de péptido RAP *in vivo*

45 El carcinoma hepatocelular humano es el quinto tumor maligno más común diagnosticado, y en todo el mundo representa cerca de 500.000 muertes al año. La extirpación quirúrgica, el trasplante y la destrucción física del tejido tumoral son las primeras opciones de tratamiento, pero sólo el 5 a 10 % de los pacientes tienen tumores adecuados para estas estrategias (20-22). Además, la quimioterapia sistémica produce bajas tasas de respuesta del 15-20 %, debido tanto a la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos como a la resistencia de las células tumorales (23-24).

50 Por ejemplo, la doxorubicina es un agente quimioterapéutico del cáncer con una alta eficacia frente una amplia variedad de tumores, y es especialmente tóxica para las células que sufren un crecimiento rápido, incluyendo las células tumorales. Sin embargo, el uso de doxorubicina en el tratamiento del carcinoma hepatocelular es limitado por la importante toxicidad hepática y cardíaca y la reducción de la producción de células sanguíneas (25). Además, las células de carcinoma hepatocelular muestran altas tasas de conversión a tipos resistentes a los fármacos (26).

Una estrategia alternativa a la terapia utiliza la radiación. Por ejemplo, un nuevo tratamiento para el cáncer de hígado que se está ensayando actualmente incluye la inyección de perlas de vidrio microscópicas, que han sido

marcadas con un material radiactivo (^{90}Y), en la arteria hepática principal, desde donde pasan a los pequeños vasos sanguíneos que irrigan el tejido tumoral. La radiación destruye entonces el tejido tumoral. Sin embargo, la derivación significativa de sangre desde la arteria hepática a los pulmones impide el uso de las perlas de vidrio en muchos pacientes. El reflujo significativo de perlas a las arterias que alimentan el tracto gastrointestinal puede causar también efectos secundarios graves. La administración eficaz de la terapia al tejido tumoral, requiere por lo tanto un enfoque más directo que no se base en materiales grandes que serán atrapados en los vasos sanguíneos.

A fin de evaluar la unión al receptor de los péptidos RAP en las células hepáticas *in vivo*, así como evaluar la capacidad de la molécula para administrar compuestos citotóxicos a las células *in vivo*, se utilizan modelos ortotópicos de carcinoma hepatocelular humano.

Para generar tumores ortotópicos en animales, las líneas celulares de hepatocarcinoma humano se implantan en ratones desnudos, ratas, u otro animal apropiado y las células tumorales se dejan crecer *in vivo*. Las líneas celulares de HCC útiles para los modelos ortotópicos incluyen, pero no se limitan a aquellas líneas celulares descritas anteriormente, tales como Heb3B, HepG2 y Huh-7. Los modelos de tumores ortotópicos de HCC son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Okubo et al. (J Gastroenterol Hepatol 2007 22: 423-8); Armengol et al, (Clin Cancer Res 2004 10: 2150-7), y Yao et al, (Clin Cancer Res 2003 9: 2719-26)..

Para establecer en primer lugar un intervalo de dosis para la administración de los péptidos RAP conjugados y de los controles *in vivo*, se lleva a cabo un estudio de intervalo de dosis pequeñas utilizando 5 ratones por grupo, que reciben péptido RAP conjugado, (por ejemplo, o péptido RAP -DMJ (hasta 200 mg/kg/día), péptido RAP-Faz (hasta 200 mg/kg/día)), o péptido RAP solo (hasta 200 mg/kg/día), DMJ o Faz solo. Los agentes de ensayo se administran intravenosa o intraperitonealmente diariamente durante dos semanas (QDx14) y los animales se analizan en cuanto al cambio en el peso corporal, cualquier observación clínica y patología clínica e histopatología del tejido al final del estudio.

Para llevar a cabo un estudio de eficacia, se utilizan 8 a 10 ratones por grupo, y se administran 3 intervalos de dosis de ensayo de los compuestos anteriores a los animales que reciben células de HCC humanas y a los animales control. Los agentes de ensayo se administran ya sea intravenosamente o intraperitonealmente y se administran con una frecuencia apropiada, por ejemplo, diariamente durante 4 semanas (QDx28), diariamente durante 3 semanas (QDx21) o diariamente durante 2 semanas (QDx14). Se evalúan los animales para cualquier cambio en el peso corporal, observaciones clínicas, y medidas de eficacia *in vivo*, tales como el volumen del tumor, la histopatología del hígado, y la patología clínica general, utilizando métodos conocidos en la técnica.

La capacidad de los péptidos RAP conjugados para reducir el crecimiento de las células de carcinoma hepatocelular *in vivo* demuestra que los péptidos se unen al receptor celular en la superficie de la célula tumoral y son un medio eficaz para administrar agentes a las células del hígado dando como resultado un efecto biológicamente medible. La demostración de la muerte tumoral eficiente en modelos animales sugiere que los péptidos RAP conjugados son un método eficaz para la administración de inhibidores de fucosidasa a las células tumorales en los seres humanos que sufren de hepatocarcinoma o de otras afecciones del hígado.

Otro modelo animal relevante para el carcinoma hepatocelular (HCC) para ensayar la biodistribución y la eficacia de los compuestos terapéuticos es la marmota oriental infectada con el virus de hepatitis de la marmota (WHV) (27). Casi todas las marmotas infectadas neonatalmente con el virus desarrollan HCC dentro de un intervalo medio de 24 meses. La mediana de la esperanza de vida es de 30 meses, sin embargo las marmotas infectadas por WHV no desarrollan cirrosis, una condición presente en la mayoría de los pacientes con HCC. El virus de la hepatitis de la marmota y el virus de la hepatitis B humana son similares en estructura, genética, métodos de transmisión, curso de la infección y la progresión a carcinoma hepatocelular. Hay similitudes importantes que ponen de relieve la importancia de este modelo. Al igual que en los seres humanos, más de la mitad de todas las marmotas expuestas al virus de la hepatitis desarrollan poco después de nacer una infección crónica y casi todas las marmotas infectadas crónicamente desarrollan carcinoma hepatocelular en aproximadamente 20 a 28 meses después de la exposición. Las marmotas neonatales inoculadas restantes desarrollan a menudo hepatitis aguda, pero desarrollarán anticuerpos contra el virus y se recuperarán. Entre el 17 y el 25 % de estos animales "recuperados" desarrollan HCC entre 29 a 56 meses después de la exposición. El desarrollo de HCC después de que aparentemente se han recuperado de la infección por hepatitis se observa también en los seres humanos.

Para determinar el efecto de los conjugados de péptido RAP-inhibidor de fucosidasa sobre la administración de agentes al hígado, y en particular a las células tumorales, se estudian la absorción y la toxicidad del control y de los compuestos terapéuticos de conjugado de péptido RAP en el modelo de HCC en marmota. En una realización, se utilizan seis marmotas infectadas crónicamente y cuatro marmotas no infectadas, de aproximadamente 1,5-2 años de edad.

Un compuesto de administración útil generalmente presentará las siguientes características: 1) no afecta adversamente a la función ya comprometida del hígado, 2) absorción medible por el hígado y por el tejido hepático maligno, 3) y después de la absorción, es tóxico para las células tumorales y produce la regresión del tumor.

La medida de los indicadores de enfermedades de almacenamiento lisosómico, incluyendo los niveles de oligosacáridos en el lisosoma, orina y sangre, se ensayan también en los modelos tumorales.

5 Es de esperar que numerosas modificaciones y variaciones en la invención tal como se ha expuesto en los ejemplos ilustrativos anteriores se les podrán ocurrir a los expertos en la técnica. En consecuencia las únicas limitaciones que se podrían poner a la invención son las que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> RAPTOR DISCOVERIES INC.

<120> MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS HEPÁTICOS CON CONJUGADOS DE PÉPTIDO DE PROTEÍNA ASOCIADA AL RECEPTOR (RAP) E INHIBIDOR DE FUCOSIDASAS

<130> P126026.EP.01

<140> PCT/US2011/022917

<141> 2011-01-28

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Ser Arg Glu Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Pro Lys Arg Glu Ser
 1 5 10 15

Gly Glu Glu Phe Arg Met Glu Lys Leu Asn Gln Leu Trp Glu Lys Ala
 20 25 30

Gln Arg Leu His Leu Pro Pro Val Arg Leu Ala Glu Leu His Ala Asp
 35 40 45

Leu Lys Ile Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Trp Lys Lys Leu Lys Leu
 50 55 60

Asp Gly Leu Asp Glu Asp Gly Glu Lys Glu Ala Arg Leu Ile Arg Asn
 65 70 75 80

Leu Asn Val Ile Leu Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Gly Lys Lys Asp Ala
 85 90 95

Arg Gln Val Thr Ser Asn Ser Leu Ser Gly Thr Gln Glu Asp Gly Leu
 100 105 110

Asp Asp Pro Arg Leu Glu Lys Leu Trp His Lys Ala Lys Thr Ser Gly
 115 120 125

Lys Phe Ser Gly Glu Glu Leu Asp Lys Leu Trp Arg Glu Phe Leu His
 130 135 140

His Lys Glu Lys Val His Glu Tyr Asn Val Leu Leu Glu Thr Leu Ser
 145 150 155 160

Arg Thr Glu Glu Ile His Glu Asn Val Ile Ser Pro Ser Asp Leu Ser
 165 170 175

Asp Ile Lys Gly Ser Val Leu His Ser Arg His Thr Glu Leu Lys Glu
 180 185 190

Lys Leu Arg Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asp Arg Leu Arg Arg Val Ser
 195 200 205

His Gln Gly Tyr Ser Thr Glu Ala Glu Phe Glu Glu Pro Arg Val Ile
 210 215 220

Asp Leu Trp Asp Leu Ala Gln Ser Ala Asn Leu Thr Asp Lys Glu Leu
 225 230 235 240

Glu Ala Phe Arg Glu Glu Leu Lys His Phe Glu Ala Lys Ile Glu Lys
 245 250 255

His Asn His Tyr Gln Lys Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys Leu Arg
 260 265 270

His Ala Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Arg Val Ser Arg Ser Arg Glu
 275 280 285

Lys His Ala Leu Leu Glu Gly Arg Thr Lys Glu Leu Gly Tyr Thr Val
 290 295 300

Lys Lys His Leu Gln Asp Leu Ser Gly Arg Ile Ser Arg Ala Arg His
 305 310 315 320

Asn Glu Leu

<210> 2
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 2

Cys Gly Lys His Phe Glu Ala Lys Ile Glu Lys His Asn His Tyr Gln
 1 5 10 15

Lys Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys Leu Arg His Ala Glu Ser Val
 20 25 30

Gly Asp Ala Glu Arg Val Ser Arg Ser Arg Glu Lys His Ala Leu Leu
 35 40 45

ES 2 555 555 T3

Glu Gly Arg Thr Lys Glu Leu Gly Tyr Thr Val Lys Lys His Leu Gln
 50 55 60

Asp Ala Cys Gly
 65

<210> 3
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 3

Cys Gly Lys His Phe Glu Ala Lys Ile Glu Lys His Asn His Tyr Gln
 1 5 10 15

Lys Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys Leu Arg His Ala Glu Ser Val
 20 25 30

Gly Asp Gly Glu Arg Val Ser Arg Ser Arg Glu Lys His Ala Leu Leu
 35 40 45

Glu Gly Arg Thr Lys Glu Leu Gly Tyr Thr Val Lys Lys His Leu Gln
 50 55 60

Asp Gly Cys
 65

<210> 4
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 4

Cys Gly Phe Arg Glu Glu Leu Lys His Phe Glu Ala Lys Ile Glu Lys
 1 5 10 15

His Asn His Tyr Gln Lys Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys Leu Arg
 20 25 30

His Ala Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Arg Val Ser Arg Ser Arg Glu
 35 40 45

Lys His Ala Leu Leu Glu Gly Arg Thr Lys Glu Leu Gly Tyr Thr Val
 50 55 60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado de péptido que comprende un péptido de la proteína asociada al receptor (RAP) unido a un inhibidor de fucosidasa, comprendiendo el péptido RAP una secuencia de polipéptidos con al menos un 80 % de homología con los aminoácidos 210-319 de RAP de la SEQ ID NO: 1, en donde el inhibidor de fucosidasa inhibe la actividad de alfa-L-fucosidasa para escindir residuos de fucosa de las glucoproteínas e induce la acumulación de oligosacáridos derivados de glucoproteína en el lisosoma,
- 10 en donde el inhibidor de fucosidasa se selecciona del grupo que consiste en L-desoxifuconojirimicina (DFJ), beta-1-C-metil-desoximanojirimicina, beta-1-C-etil-desoximanojirimicina, beta-1-C-fenil-desoximanojirimicina, ácido ((3R,4R,5S,6S)-1-butil-4,5,6-trihidroxi-azepano-3-carboxílico (Faz), beta-L-homofuconojirimicina, (1-alfa,2-beta,3-alfa o beta, 4-alfa,5-alfa o beta)-2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)-ciclopentilaminas sustituidas y 2,6-imino-2,6,7-tridesoxi-D-glicero-D-gluco-heptitol.
- 15 2. Un conjugado de péptido que comprende un péptido de la proteína asociada al receptor (RAP) unido a un inhibidor de fucosidasa, comprendiendo el péptido RAP un polipéptido con al menos un 80 % de homología con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2, en donde el inhibidor de fucosidasa inhibe la actividad de alfa-L-fucosidasa para escindir residuos de fucosa de las glucoproteínas e induce la acumulación de oligosacáridos derivados de glucoproteína en el lisosoma,
- 20 en donde el inhibidor de fucosidasa se selecciona del grupo que consiste en L-desoxifuconojirimicina (DFJ), beta-1-C-metil-desoximanojirimicina, beta-1-C-etil-desoximanojirimicina, beta-1-C-fenil-desoximanojirimicina, ácido ((3R,4R,5S,6S)-1-butil-4,5,6-trihidroxi-azepano-3-carboxílico (Faz), beta-L-homofuconojirimicina, (1-alfa,2-beta,3-alfa o beta, 4-alfa,5-alfa o beta)-2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)-ciclopentilaminas sustituidas y 2,6-imino-2,6,7-tridesoxi-D-glicero-D-gluco-heptitol.
- 25 3. El conjugado de péptido de la reivindicación 2, en donde el péptido RAP comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2.
4. El conjugado de péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inhibidor de fucosidasa se conjuga mediante un enlazador peptídico.
5. El conjugado de péptido de la reivindicación 4, en donde el enlazador peptídico es un dendrímero de lisina K4K2K.
- 30 6. El conjugado de péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se conjugan al menos 4 inhibidores de fucosidasa por molécula de péptido RAP, o en donde se conjugan al menos 8 inhibidores de fucosidasa por molécula de péptido RAP.
7. Un conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de un tumor hepático en un sujeto que lo necesite.
- 35 8. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el tumor hepático es un resultado de carcinoma hepatocelular, infección por el virus de la hepatitis, cirrosis, daño hepático tóxico, y hemocromatosis hereditaria.
9. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como se reivindica en la reivindicación 7 u 8, en donde el tratamiento produce una reducción del sitio del tumor hepático en el sujeto, o una reducción de los niveles de alfa-fetoproteína en la sangre del sujeto en comparación con los niveles antes del tratamiento.
- 40 10. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el conjugado de péptido se administra por vía intravenosa.
- 45 11. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el conjugado de péptido se administra en combinación con un segundo agente.
12. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como se reivindica en la reivindicación 11, en donde el segundo agente es un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en doxorubicina y 5-fluorouracilo.
- 50 13. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como se reivindica en la reivindicación 11, en donde el segundo agente es un agente citotóxico o un radioisótopo.
14. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como se reivindica en la reivindicación 11, en donde el tumor hepático se asocia con una infección del virus de la hepatitis, y el segundo agente es un agente antivírico.

15. El conjugado de péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el inhibidor de la fucosidasa induce un suceso citotóxico en las células.

FIGURA 3

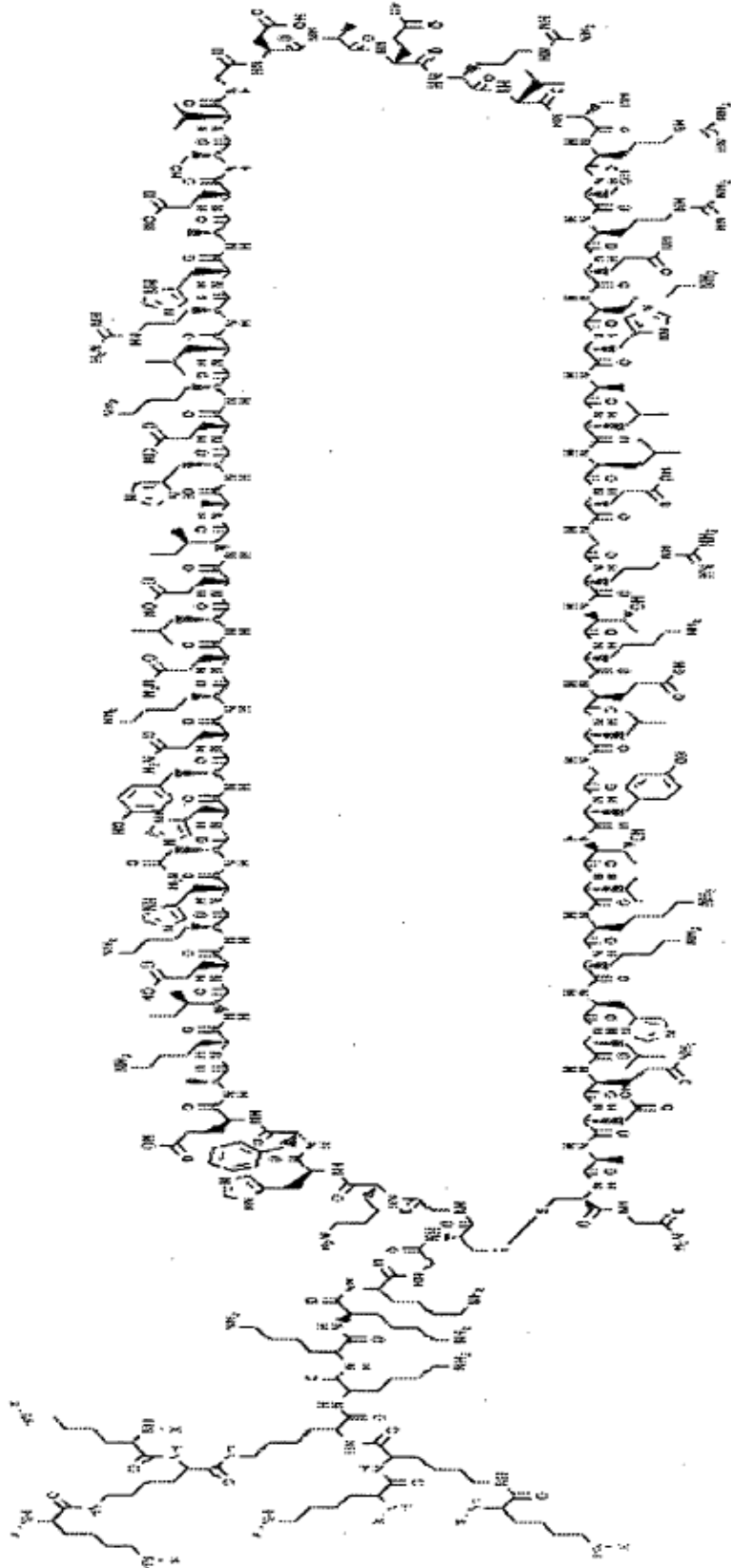


Figura 4

