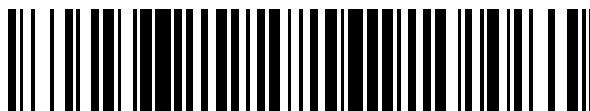


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 148**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2009 PCT/CA2009/000542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09127072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2009 E 09733078 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2279008**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de paclitaxel, análogos de paclitaxel o conjugados de paclitaxel y métodos relacionados de preparación y uso**

30 Prioridad:

18.04.2008 US 124677 P

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

29.07.2019

73 Titular/es:

**ANGIOCHEM INC. (100.0%)
4150 rue Ste. Catherine Ouest, Suite 490
Westmount, QC H3Z 2Y5, CA**

72 Inventor/es:

**DEMEULE, MICHEL;
CHE, CHRISTIAN;
REGINA, ANTHONY;
BELIVEAU, RICHARD;
GAGNON, CATHERINE;
CASTAIGNE, JEAN-PAUL y
GABATHULER, REINHARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 721 148 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

Composiciones farmacéuticas de paclitaxel, análogos de paclitaxel o conjugados de paclitaxel y métodos relacionados de preparación y uso

Antecedentes de la invención

5 La invención se refiere a formulaciones de conjugados de paclitaxel según los especificado en las reivindicaciones.

Debido a la insolubilidad en solución acuosa, los agentes hidrófobos, tales como el paclitaxel y los análogos de paclitaxel, normalmente se solubilizan en tampones no acuosos o tensioactivos, o se unen a fracciones hidrófilas para aumentar la solubilidad en solución acuosa antes de la administración a un paciente. El paclitaxel se suministra comercialmente en una formulación en donde cada ml contiene 6 mg de paclitaxel, 527 mg de Cremophor® EL purificado (aceite de ricino polioxietilado) y 49,7 % (v/v) de alcohol deshidratado, USP y etanol. Antes de la administración, se diluye el paclitaxel formulado en cloruro de sodio/dextrosa o dextrosa en solución de Ringer. Debido a que el Cremophor puede causar reacciones de hipersensibilidad (por ejemplo, anafilácticas), los pacientes que reciben paclitaxel se medican previamente con dexametasona para reducir la aparición de estas reacciones. Debido a estas reacciones, el paclitaxel se administra durante 4 horas para minimizar los efectos de hipersensibilidad.

15 Debido a la alta tasa de efectos secundarios debido a la inclusión de Cremophor en las formulaciones de paclitaxel convencionales, se han creado formulaciones alternativas. Estas formulaciones se basan en la asociación de paclitaxel con un compuesto soluble. Abraxane es una formulación de paclitaxel en donde el paclitaxel está unido a albúmina. También se han propuesto formulaciones de paclitaxel liposomal.

Debido a que las formulaciones existentes de agentes hidrófobos, tales como el paclitaxel, contienen excipientes no deseados o pueden ser difíciles de fabricar, existe la necesidad de nuevas formulaciones de dichos agentes.

20 El documento WO 2004/060403 A2 describe aprotinina como un vehículo para transportar un agente a través de la barrera hematoencefálica.

El documento WO 2006/089290 A1 describe métodos de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas que comprenden administrar una nanopartícula que comprende un taxano y albúmina, y administrar además otro agente quimioterapéutico.

25 El documento WO 02/43765 A2 describe formulaciones de paclitaxel exentas de cremophor®.

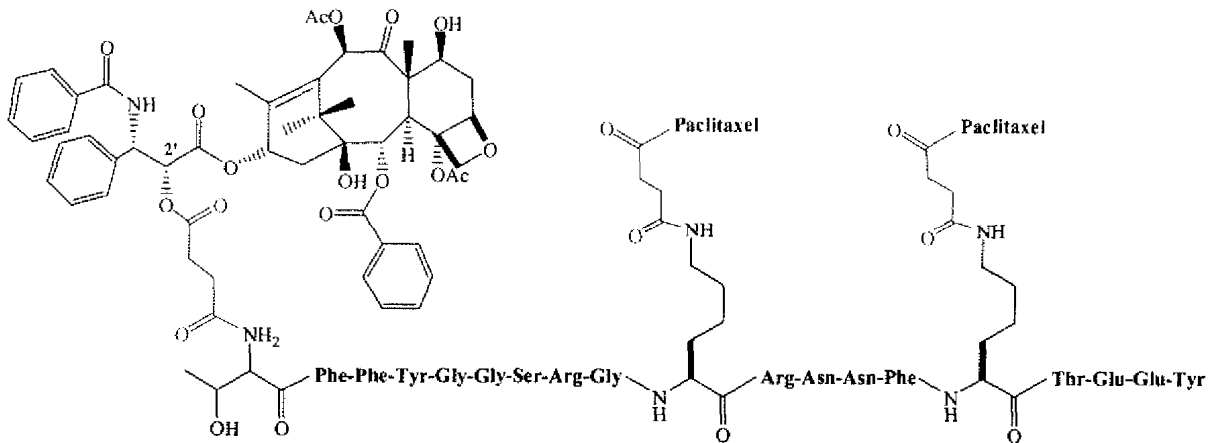
Los documentos WO 2007/009229 A1, WO 2006/086870 A1 y WO 2008/144919 A1 describen polipéptidos de aprotinina como vehículos para la administración de fármacos.

Compendio de la invención

30 Se describe una composición que incluye (a) un agente hidrófobo, paclitaxel, un análogo de paclitaxel o un conjugado (por ejemplo, ANG1005) que incluye (i) un vector polipeptídico; e (ii) un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel y un análogo de paclitaxel, en donde el agente terapéutico se conjuga con un polipéptido, o cualquier agente hidrófobo descrito en la presente memoria); (b) un agente de tonicidad opcional (por ejemplo, cloruro de sodio o cualquier agente de tonicidad descrito en la presente memoria); (c) un agente de tamponamiento (por ejemplo, glicina, ácido láctico o ácido cítrico, o cualquier agente de tamponamiento descrito en la presente memoria); y (d) un agente de carga (por ejemplo, manitol, sorbitol o cualquier agente de carga descrito en la presente memoria); y (e) un agente solubilizante (por ejemplo, éster de polioxietileno de un ácido graso tal como Solutol HS 15, o cualquier agente solubilizante descrito en la presente memoria), por ejemplo, en donde el agente solubilizante no es Cremophor. El vector polipeptídico puede incluir una secuencia de aminoácidos esencialmente idéntica (por ejemplo, al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica) a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-105 y 107-116 (por ejemplo, AngioPep-1 (SEQ ID NO:67); AngioPep-2 (SEQ ID NO: 97) o AngioPep-7 (SEQ ID NO: 112)). En determinadas realizaciones, el agente de tamponamiento mantiene la solución a un pH inferior a 6 (por ejemplo, pH 4-6). En determinadas realizaciones, la composición incluye además del 0,01 al 10 % (por ejemplo, menos del 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,2 % o 0,1 %) de DMSO. En determinadas realizaciones, la composición está esencialmente exenta de Cremophor (por ejemplo, exenta de Cremophor). La composición puede disolverse en agua.

45 En una realización, la presente invención se refiere a una composición liofilizada que comprende:

(a) ANG1005, en donde ANG1005 tiene la estructura:



- (b) un agente de tonicidad opcional;
- (c) un agente de tamponamiento;
- (d) un agente de carga;
- 5 (e) un agente solubilizante, en donde dicho agente solubilizante es un éster de polioxietileno de un ácido graso; y
- (f) del 0,2 al 10 % de DMSO.

En determinadas realizaciones, la composición liofilizada comprende agentes en las cantidades mostradas en cualquiera de las Tablas 1-4.

Tabla 1

Compuesto	Porcentaje (en peso sin agua)
ANG1005	0,1-5 %
Agente de tonicidad	0-15 %
Agente de tamponamiento	1-10 %
Agente de carga	0-15 %
Solutol HS 15	40-75 %
DMSO	0,2-10 %

10

Tabla 2

Compuesto	Porcentaje (en peso sin agua)
ANG1005	1,8-2,3 %
Agente de tonicidad	9-11 %
Tampón	4,5-6 %
Agente de carga	8-10 %
Solutol HS 15	69-75 %
DMSO	0,2-1 %

Tabla 3

Compuesto	Porcentaje (en peso sin agua)
ANG1005	1,8-4,0 %
Tampón	0,1-6 %
Agente de carga	2-10 %
Solutol HS 15	80-95 %
DMSO	0,2-1 %

Tabla 4

Compuesto	Porcentaje (en peso sin agua)
ANG1005	2,0-3,0 %
Tampón	0,5-6 %
Agente de carga	4-7 %
Solutol HS 15	85-95 %
DMSO	0,2-0,6 %

5 En estas composiciones, el agente de tonicidad, si está presente, puede ser cloruro de sodio, el agente de tamponamiento puede ser glicina, ácido láctico o ácido cítrico, y/o el agente de carga puede ser manitol. La composición puede estar compuesta del aproximadamente 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,1, 1,2, 1,3 %, 1,4 %, 1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2,0 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 3,0 %, 3,2 %, 3,5 %, 4,0 % o 5,0 % de ANG1005, o cualquier intervalo entre cualquiera de estos valores. El ANG1005 se puede disolver en una cantidad suficiente de Solutol HS 15 y/o DMSO, que se puede diluir más en una solución acuosa.

10 Las composiciones anteriores pueden estar presentes en un recipiente que puede estar cerrado herméticamente. El recipiente puede ser parte de un kit que incluya además instrucciones de uso (p. ej., para administrar la composición para el tratamiento de cualquier enfermedad, como se describe en la presente memoria).

15 Se describe un método para administrar una composición de los aspectos anteriores al paciente que padece una enfermedad, por ejemplo, cualquier enfermedad descrita en la presente memoria, tal como cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario, cerebro, pulmón, hígado, bazo o riñón).

20 El método incluye administrar al paciente la composición en una cantidad suficiente para tratar o tratar profilácticamente la enfermedad. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer cerebral seleccionado del grupo que consiste en glioblastoma, astrocitoma, glioma, meduloblastoma y oligodendroma, neuroglioma, ependimoma y meningioma.

En otro aspecto, la invención presenta un método para preparar una composición farmacéutica liofilizada de la presente invención que comprende:

- (a) disolver dicho conjugado en un primer agente solubilizante para formar una mezcla;
- (b) añadir un segundo agente solubilizante a la mezcla de la etapa (a);
- 25 (c) opcionalmente, añadir agua y un agente de tamponamiento a dicha mezcla;
- (d) liofilizar la mezcla de la etapa (c); en donde dicha liofilización produce una reducción de al menos el 20 % de la cantidad de dicho primer agente solubilizante, pero no reduce sustancialmente la cantidad de dicho segundo agente solubilizante.

30 Se describe un método que incluye (a) disolver un agente hidrófobo en un primer agente solubilizante (por ejemplo, DMSO o cualquiera de dichos agentes descritos en la presente memoria) para formar una mezcla; (b) añadir un segundo agente solubilizante (p. ej., un éster de polioxietileno de un ácido graso tal como Solutol HS 15, o cualquiera de los agentes descritos en la presente memoria) a la mezcla de la etapa (a); (c) opcionalmente, añadir agua y un agente de tamponamiento a la mezcla; (d) liofilizar la mezcla de la etapa (c); en donde la liofilización produce una reducción de al menos el 5 % (p. ej., 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 % o 99 %) de la cantidad del primer

agente solubilizante (p. ej., a una proporción final inferior al 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 %, 1,0 %, 1,5 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 8 % del peso total del producto liofilizado). En determinadas realizaciones, la liofilización no reduce sustancialmente la cantidad del segundo agente solubilizante. En determinadas realizaciones, el agente hidrófobo incluye paclitaxel o un análogo de paclitaxel. El agente hidrófobo puede incluir o puede ser un conjugado que incluya (a) un vector polipeptídico y (b) un agente descrito en la presente memoria (por ejemplo, paclitaxel y sus análogos), en donde el agente está conjugado con el vector. El vector polipeptídico puede ser esencialmente idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-105 y 107-116 (por ejemplo, AngioPep-1 (SEQ ID NO:67); AngioPep-2 (SEQ ID NO: 97) o AngioPep-7 (SEQ ID NO: 112)). En realizaciones particulares, el conjugado es ANG1005. En determinadas realizaciones, el agua y un agente de tamponamiento se añaden en la etapa (c), y la liofilización de la etapa (d) incluye (i) congelar la mezcla; (ii) secar el producto congelado a una primera temperatura y presión suficientes para eliminar al menos una parte (p. ej., al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o 99,99 %) del agua; e (iii) secar el producto a una segunda temperatura y presión suficientes para eliminar al menos una parte (p. ej., al menos un 5 % (p. ej., 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 % o 99 %) del primer disolvente. La mezcla de la etapa (b) se puede filtrar antes de la etapa (c) de liofilización o se puede colocar en un vial o un recipiente antes de la etapa (c) de liofilización. El método puede incluir además (c) volver a suspender el producto liofilizado.

Se describe un método para producir una composición farmacéutica que incluye las etapas (a) disolver en DMSO un conjugado que incluye paclitaxel o análogo de paclitaxel conjugado a un vector polipeptídico, formando así una mezcla; (b) añadir Solutol HS 15 a la mezcla; (c) añadir agua, un agente de tamponamiento y, opcionalmente, sal o un agente de carga a la mezcla; y (d) liofilizar la mezcla en condiciones que eliminen el agua y el DMSO de la mezcla. El Solutol HS 15 se puede mezclar con agua, un agente de tamponamiento y, opcionalmente, un agente de tonicidad o un agente de carga antes de añadirlo a la mezcla, en donde el agua, el agente de tamponamiento y el agente de tonicidad opcional se añaden en una cantidad que mantiene la solubilidad del conjugado en la mezcla. El agente de tamponamiento puede mantener la solución a un pH de entre 4 y 6. El DMSO se puede acidificar entre pH 3,5 y 4,5 antes de la etapa (a) de disolución. En determinadas realizaciones, la liofilización no reduce esencialmente la cantidad de Solutol HS 15 en la mezcla. El conjugado puede incluir cualquiera de los polipéptidos (p. ej., AngioPep-2) descritos en la presente memoria. En realizaciones particulares, el conjugado de polilitaxel-polipéptido es ANG1005.

Se describe una composición farmacéutica producida mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Por "agente de tamponamiento" se entiende cualquier compuesto o grupo de compuestos capaz de mantener el pH (p. ej., entre cualquier valor de pH 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0 y 13,5) de una solución dentro de un determinado intervalo tras la adición de agentes que puedan alterar el pH. En la presente memoria, se describen agentes de tamponamiento ilustrativos.

Por "agente de tonicidad" se entiende cualquier agente que modifica la osmolaridad de una solución acuosa (p. ej., cualquiera o cualquier intervalo de entre 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1.000, 1.500 o 2.000 mM). Se pueden usar sales iónicas, tales como el cloruro de sodio, para ajustar la tonicidad. En la presente memoria, se describen agentes de tonicidad adicionales.

Por "agente de carga" se entiende un compuesto que modifica la forma física de una composición química tras un procedimiento de deshidratación o liofilización. En la presente memoria, se describen agentes de carga ilustrativos.

Por "agente solubilizante" se entiende cualquier disolvente capaz de disolver un determinado compuesto (p. ej., un compuesto hidrófobo, tal como un compuesto o conjugado que contiene paclitaxel o un análogo de paclitaxel). En la presente memoria, se describen agentes solubilizantes ilustrativos adecuados para los compuestos hidrófobos.

Por "vector" se entiende un compuesto o una molécula tal como un polipéptido que puede transportarse a un determinado tipo de célula (p. ej., hígado, pulmones, riñón, bazo o músculo) o a través de la BHE. El vector puede unirse a (covalentemente o no) o conjugarse con un agente y, por lo tanto, puede ser capaz de transportar el agente a un determinado tipo de célula o a través de la BHE. En determinadas realizaciones, el vector puede unirse a los receptores presentes en las células cancerosas o en las células endoteliales del cerebro y, por lo tanto, se puede transportar a la célula cancerosa o a través de la BHE mediante transcitosis. El vector puede ser una molécula para la que se pueden obtener altos niveles de transporte transendotelial, sin afectar a la integridad de la célula o de la BHE. El vector puede ser un polipéptido o un peptidomimético y puede ser natural o producido mediante síntesis química o tecnología genética recombinante.

Por "conjugado" se entiende un vector enlazado a un agente. La conjugación puede ser de naturaleza química, tal como a través de un enlazador, o de naturaleza genética, por ejemplo, mediante tecnología genética recombinante, tal como en una proteína de fusión con, por ejemplo, una molécula indicadora (p. ej., proteína verde fluorescente, β -galactosidasa, marcador de His, etc.).

Por un vector o conjugado que "se transporta eficazmente a un determinado tipo de célula" se entiende un vector o conjugado que puede acumular (p. ej., debido a un mayor transporte hacia la célula, disminución del flujo de salida de la célula o una combinación de los mismos) en ese tipo de células al menos el 10 % (p. ej., 25 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 %, 1.000 %, 5.000 % o 10.000 %) más que bien una sustancia de control, o, en el caso de un conjugado, en

comparación con el agente no conjugado.

Por “esencialmente puro” o “aislado” se entiende un compuesto (p. ej., un polipéptido o conjugado) que se ha separado de otros componentes químicos. Por lo general, el compuesto es esencialmente puro cuando es al menos un 30 %, en peso, exento de otros componentes. En determinadas realizaciones, el preparado es al menos un 50 %, 60 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % en peso, exento de otros componentes. Se puede obtener un polipéptido purificado, por ejemplo, mediante la expresión de un polinucleótido recombinante que codifique dicho polipéptido o sintetizando químicamente el polipéptido. La pureza se puede medir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis por HPLC.

Una composición farmacéutica que está “esencialmente exenta” de una sustancia significa que la cantidad de una sustancia en la composición es inferior al 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 % o 0,01 % del peso seco de una composición.

Por “esencialmente idéntico” se entiende un polipéptido o ácido nucleico que presente al menos un 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, o incluso 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de referencia. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación, en general, será de al menos 4 (p. ej., al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50 o 100) aminoácidos. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación, en general, será de al menos 60 nucleótidos, preferiblemente de al menos 90 nucleótidos, y más preferiblemente, de al menos 120 nucleótidos, o de longitud completa. Debe entenderse en la presente memoria que se pueden encontrar huecos entre los aminoácidos de un análogo que son idénticos o similares a los aminoácidos del polipéptido original. Los huecos pueden no incluir aminoácidos, uno o más aminoácidos que no sean idénticos o similares al polipéptido original. En la presente memoria, se incluyen análogos biológicamente activos de los vectores (polipéptidos). El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, con el algoritmo GAP, BESTFIT o FASTA en la versión 7.0 del paquete de software de Wisconsin Genetics, usando ponderaciones de hueco predeterminadas.

Por “fragmento” se entiende un polipéptido que procede de una parte de una secuencia original o precursora, o de un análogo de dicha secuencia precursora. Los fragmentos abarcan polipéptidos que tienen truncamientos de uno o más aminoácidos, en donde el truncamiento puede originarse desde el extremo amino (extremo N), el extremo carboxi (extremo C) o desde el interior de la proteína. Un fragmento puede incluir la misma secuencia que la parte correspondiente de la secuencia original. La descripción abarca fragmentos funcionales del vector (polipéptido) descrito en la presente memoria. Los fragmentos pueden ser de al menos 5 (p. ej., al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 100 o 150) aminoácidos. Los fragmentos de la descripción pueden incluir, por ejemplo, un polipéptido de 7, 8, 9 o 10 aminoácidos a 18 aminoácidos. Los fragmentos pueden contener cualquiera de las modificaciones descritas en la presente memoria (p. ej., acetilación, amidación, sustituciones de aminoácidos).

Un “aminoácido no natural” es un aminoácido que no se produce de forma natural o no se encuentra en un mamífero.

Por “agente” se entiende cualquier compuesto, por ejemplo, un anticuerpo o un agente terapéutico, un marcador, un indicador o un compuesto de generación de imágenes.

Por “agente terapéutico” se entiende un agente que tiene una actividad biológica. En algunos casos, el agente terapéutico se usa para tratar los síntomas de una enfermedad, una afección física o mental, una lesión o una infección, e incluye agentes contra el cáncer, antibióticos, agentes antiangiogénicos y moléculas activas al nivel del sistema nervioso central.

Por “fármaco de molécula pequeña” se entiende un fármaco que tiene un peso molecular de 1.000 g/mol o inferior (p. ej., inferior a 800, 600, 500, 400 o 200 g/mol).

Por “sujeto” se entiende un animal humano o no humano (p. ej., un mamífero).

Por “tratar” una enfermedad, un trastorno o una afección en un sujeto se entiende reducir al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección mediante la administración de un agente terapéutico al sujeto.

Por “tratamiento profiláctico” de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto se entiende reducir la frecuencia de aparición (p. ej., prevenir) una enfermedad, un trastorno o una afección mediante la administración de un agente terapéutico al sujeto.

Por “cáncer” se entiende cualquier proliferación celular cuyo rasgo único es la pérdida de controles normales que pueden resultar en un crecimiento no regulado, falta de diferenciación o capacidad para invadir tejidos y hacer metástasis. El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido o en cualquier órgano. Se pretende que el cáncer incluya, sin limitación, cáncer de cerebro, hígado, pulmones, riñón o bazo. En la presente memoria, se describen cánceres adicionales.

Por “administrar” y “administración” se entiende un modo de administración que incluye, sin limitación, la vía oral, intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica u oral. Una dosis diaria

se puede dividir en una, dos o más dosis en una forma adecuada para la administrarse una, dos o más veces durante un período de tiempo.

5 Por “terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se entiende una cantidad de un agente terapéutico suficiente para mejorar, disminuir, prevenir, retrasar, suprimir o detener cualquier síntoma de la enfermedad o afección que se esté tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente no necesita curar una enfermedad o afección, sino proporcionar un tratamiento para una enfermedad o afección de modo que se retrase, se obstaculice o se prevenga el inicio de la enfermedad o afección, o se mejoren los síntomas de la enfermedad o afección, o el término de la enfermedad o afección cambie o, por ejemplo, sea menos grave o la recuperación se acelere en un individuo.

10 Si se menciona un “intervalo” o “grupo de sustancias” con respecto a una característica particular (p. ej., temperatura, concentración, tiempo y similares), la invención se refiere a e incorpora explícitamente en la presente memoria todos y cada uno de los miembros específicos y combinación de subintervalos o subgrupos en los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, con respecto a una longitud de 9 a 18 aminoácidos, se ha de entender que incorpora específicamente en la presente memoria cada longitud individual, p.ej., una longitud de 18, 17, 15, 10, 9, y cualquier número de entre los mismos. Por lo tanto, a menos que se mencione específicamente, cada intervalo mencionado en la presente memoria debe entenderse como inclusivo. Por ejemplo, en la expresión de 5 a 19 aminoácidos, la longitud debe incluir 5 y 19. Esto se aplica de manera similar con respecto a otros parámetros tales como secuencias, longitud, concentraciones, elementos y similares.

20 Las secuencias, regiones, partes definidas en la presente memoria incluyen cada secuencia, región y parte individual que se describe, así como todas y cada una de las posibles subsecuencias, subregiones y subpartes si dichas subsecuencias, subregiones y subpartes se definen como aquellas que incluyen positivamente determinadas posibilidades, que excluyen determinadas posibilidades o una combinación de las mismas. Por ejemplo, una definición de exclusión para una región puede decir lo siguiente: “siempre que dicho polipéptido no sea más corto que 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos”. Otro ejemplo de una limitación negativa es el siguiente; una secuencia que incluye la SEQ ID NO: X con la exclusión de un polipéptido de SEQ ID NO: Y; etc. Un ejemplo adicional de una limitación negativa es el siguiente; siempre que dicho polipéptido no sea (no incluya ni consista en) la SEQ ID NO: Z.

25 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

30 La **Figura 1** es una representación esquemática de un método ilustrativo para preparar una composición farmacéutica que incluye ANG1005.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra los perfiles de HPLC de ANG1005 reconstituido para la inyección diluida en D5W a 1,0 mg/ml en condiciones de uso clínico a lo largo del tiempo.

La **Figura 3** es un gráfico que muestra el perfil de HPLC del sedimento centrifugado recogido de la muestra a 2,0 mg/ml y ~6 h de almacenamiento, y solubilizado en DMSO.

35 Descripción detallada

Los presentes inventores han desarrollado formulaciones farmacéuticas útiles para agentes terapéuticos hidrófobos, que incluyen paclitaxel y análogos de paclitaxel, o sus conjugados (p. ej., ANG1005), y métodos para preparar y administrar composiciones farmacéuticas con dichas formulaciones. Los agentes terapéuticos hidrófobos (p. ej., paclitaxel) se suelen solubilizar (y, de hecho, suelen requerir) disolventes hidrófobos. Los disolventes de uso común para el paclitaxel incluyen Cremophor y DMSO, que pueden no ser bien tolerados por los pacientes. El Cremophor, en particular, puede causar reacciones anafilácticas, por lo que requiere un tratamiento previo con agentes tales como corticosteroides. Para evitar el uso de disolventes tan mal tolerados, se han desarrollado nuevas formulaciones para el conjugado de polipéptido-paclitaxel ilustrativo, ANG1005. Las formulaciones descritas en la presente memoria son ventajosas en tanto en cuanto pueden fabricarse sin el uso de Cremophor, pueden prepararse para contener 40 concentraciones mínimas de DMSO, dar lugar a una baja degradación y una alta actividad del agente activo, y pueden fabricarse usando métodos convencionales. Las composiciones que no contienen excipientes mal tolerados pueden administrarse a pacientes a dosis más altas, pueden administrarse más rápidamente (p. ej., en el caso de la administración intravenosa), pueden administrarse con mayor frecuencia o pueden evitar la necesidad de pretratamientos con agentes (p. ej., corticosteroides) para aumentar la tolerancia a dichos excipientes.

50 Desarrollo de una formulación para ANG1005

Al desarrollar una nueva formulación del agente hidrófobo ilustrativo, ANG1005, primero se probó su solubilidad en varios disolventes y combinaciones de disolventes. Como se describe en el Ejemplo 1, y al igual que con el paclitaxel, ANG1005 tiene baja solubilidad en las soluciones acuosas, pero es altamente soluble en el DMSO (120 mg/ml). El ANG1005 también fue soluble en Solutol HS 15 (BASF, Parsippany, N. J.) con etanol a 75 °C (6 mg/ml). Debido a su 55 baja toxicidad y a su compatibilidad con el fármaco, se seleccionó el Solutol HS 15 como agente de solubilización. Sin embargo, la disolución en el Solutol HS 15 por sí mismo produjo una degradación significativa de ANG1005. Para

disolver el ANG1005, se calentó el Solutol HS 15 hasta al menos 65 °C. Además, se observó que el calentamiento del Solutol no tamponado de 25 °C a 50 °C aumentó su pH de 6,0 a 9,0. Por lo tanto, la combinación de alta temperatura y alto pH probablemente contribuye a la inestabilidad que se observó en el ANG1005 en estas condiciones.

- 5 Para evitar una degradación excesiva, primero se disolvió el ANG1005 en DMSO acidificado (pH 3,5-4,0) antes de la adición de Solutol a 50 °C (véase el Ejemplo 2). Para estabilizar aún más, el ANG1005, se acidificó el Solutol HS 15 mezclando previamente con tampón de glicina a pH 5,0, lo que mantiene la solubilidad del ANG1005. Al hacerlo, se minimiza la degradación del ANG1005. Es posible añadir hasta el 20 % (p. ej., 1 %, 5 %, 10 % o 15 %) del tampón al Solutol antes de la adición de ANG1005 sin afectar a la solubilidad de ANG1005, mientras que mezclar una mayor cantidad de tampón con el Solutol produce una solubilización incompleta.
- 10 Para garantizar la estabilidad del ANG1005, se diluyó la formulación en solución acuosa tamponada a pH 5 con glicina, ya que se observó que el ANG1005 se vuelve cada vez más inestable a pH 6 y superior. Se evaluaron otros tampones en este intervalo de pH, incluyendo el acetato y el fosfato, pero estos fueron menos compatibles con la formulación. También se intentó estabilizar el ANG1005 reduciendo el pH final a 4, pero la torta liofilizada resultante no se reconstituyó en una solución transparente.
- 15 En la siguiente Tabla 5, se proporciona una composición ilustrativa de ANG1005.

Tabla 5: Función de los componentes de ANG1005 para inyección

Componente	Fin	Cantidad/lote diana	Cantidad/vial diana
ANG1005	IFA	60 g	120 mg
Cloruro de sodio, USP	Osmolaridad	290 g	580 mg
Glicina	Tampón	150 g	300 mg
Manitol	Agente de carga	260 g	520 mg
Solutol HS 15	Solubilización del IFA	2.000 ml	4 ml
DMSO	Solubilización del IFA antes de la liofilización	500 ml ¹	1 ml ¹
HCl	ajuste del pH	hasta ajustar el pH	
Agua para inyección, USP	Disolvente	cs hasta 10 l ¹	hasta 20 ml ¹

¹Eliminado por liofilización

También se añadieron agentes de carga para facilitar la reconstitución del producto liofilizado. Se evaluaron formulaciones que contenían tanto manitol como sorbitol. El manitol produjo una torta superior.

Liofilización

- 20 Dado que el preparado de DMSO/Solutol/tampón contenía niveles indeseablemente altos de DMSO y no era lo suficientemente estable, se desarrolló un protocolo de liofilización diseñado para reducir el DMSO y aumentar la estabilidad de ANG1005. Se evaluaron varios ciclos de liofilización alternativos para minimizar el contenido de DMSO (es decir, aumentando la temperatura y la duración del secado secundario; véase el Ejemplo 3). A continuación, se describen detalladamente las condiciones de liofilización. Se intentó un primer protocolo de liofilización, y este
- 25 procedimiento produjo concentraciones de DMSO superiores al 1 %. En la Tabla 6, se muestran los detalles de este procedimiento.

Tabla 6

Ciclo de liofilización para ANG1005 para inyección			
Etapa	Temperatura	Vacío	Tiempo de retención
Carga	≤-40 °C	Atmosférica	N/A
Congelación	≤-40 °C	Atmosférica	3 ± 1 horas

ES 2 721 148 T3

Secado primario	≥-25 °C	6,57 x 10 ⁻⁵ atm (50 mT)	90 ± 1 horas
Secado secundario	≥22 °C	6,57 x 10 ⁻⁵ atm (50 mT)	9 ± 1 horas
Detención	≥22 °C	6,58 x 10 ⁻³ -13,16 x 10 ⁻³ atm (5-10 mmHg)	N/A

Se ha podido reducir aún más la concentración de DMSO, hasta menos del 1 %, mediante el uso de un procedimiento de secado de dos etapas optimizado. En resumen, después de la congelación del producto, se lleva a cabo la liofilización a una temperatura de almacenamiento y durante un tiempo suficientes para eliminar la mayor parte del agua del producto. La temperatura de almacenamiento se eleva y el producto se seca a una temperatura adecuada para la eliminación del DMSO. Las condiciones exactas variarán según el volumen de la muestra que se esté secando, la presión y las temperaturas usadas, y la formulación y los tampones usados. Basándose en el procedimiento descrito en la presente memoria, un experto en la técnica sería capaz de determinar las condiciones de secado apropiadas para generar las composiciones descritas en la presente memoria.

En un procedimiento ilustrativo, la fórmula se carga a una temperatura de entre -70 y +25 °C (p. ej., -40 °C). La temperatura se eleva hasta una temperatura establecida suficiente para congelar la solución (cualquier temperatura entre de 0 °C y -70 °C, tal como -40 °C) y la temperatura se mantiene a esa temperatura durante un tiempo suficiente para congelar el producto, y preferiblemente durante un tiempo suficiente para garantizar que la torta de liofilización no se deshaga. Se determinó que, a -40 °C, se necesitaron al menos 12 horas (p. ej., al menos 15, 18, 20, 24, 36 o 48 horas) de tiempo de congelación para garantizar que la torta no se deshiciere. Tras la congelación, se ajustó el vacío a una presión (p. ej., 1,32 x 10⁻⁵-65,79 x 10⁻⁵ atm (10-500 mT), tal como 2,63 x 10⁻⁵, 6,57 x 10⁻⁵, 1,31 x 10⁻⁴, 2,63 x 10⁻⁴, 6,57 x 10⁻⁴ atm (20, 50, 100, 200 o 500 mT) y temperatura (p. ej., de -15 a -35 °C, tal como -25 °C) suficiente para eliminar el agua del producto para el ciclo de secado primario. Para este fin, se probaron presiones de entre 1,32 x 10⁻⁵ y 1,31 x 10⁻⁴ atm (10 y 100 mT) con una variación mínima en los resultados. El tiempo de secado puede ser suficiente (p. ej., al menos 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días o 14 días) para eliminar una parte sustancial (p. ej., al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %) del agua presente en el producto. Tras el ciclo de secado primario, se realizó un ciclo de secado secundario para eliminar el DMSO. El producto se elevó hasta una temperatura más alta de entre 10-30 °C (p. ej., 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27 °C) para eliminar el DMSO. En una realización preferida, la temperatura de almacenamiento aumenta hasta 27 °C durante 2 horas y luego se mantiene a 27 °C durante una hora. La temperatura de almacenamiento se aumenta luego (o se mantiene) entre 23 y 27 °C durante 30 minutos y luego se mantiene a esa temperatura durante al menos otras 10 horas (p. ej., al menos 15, 20, 25, 30, 40, 48, 60 o 72 horas). Para evitar que se funda el DMSO residual, el producto se puede mantener por debajo de 25 °C. En la Tabla 7, se muestra un protocolo ilustrativo para este método. La liofilización se realizó usando un secador congelador Hull, Modelo 72FS100-SS20C.

Tabla 7

Segmento	Operación	Temperatura	Tiempo
1	Punto de fijación de la carga	-40 °C	N/A
CONGELACIÓN			
2	Almacenamiento con desnivel hasta	-40 °C	0 minutos
3	Almacenamiento manteniendo a	-40 °C	420-1.440 minutos
SECADO PRIMARIO			
Se fija el control de vacío en 6,57 x 10 ⁻⁵ atm (50 mT) y se fija el control del condensador en -50 °C durante las etapas 4-7			
4	Almacenamiento con desnivel hasta	-25 °C	120 minutos
5	Almacenamiento manteniendo a	-25 °C	5.760 minutos
SECADO SECUNDARIO			
6	Almacenamiento con desnivel hasta	27 °C	120 minutos
7	Almacenamiento manteniendo a	27 °C	60 minutos
8	Almacenamiento con desnivel hasta	23-27 °C	30 minutos
9	Almacenamiento manteniendo a	23-27 °C	900-1200 minutos

Reconstitución del producto

Antes de inyectarlo a un paciente o del análisis de laboratorio del producto, el producto liofilizado se puede reconstituir. Se pueden usar uno o más tampones o disolventes cualquiera, o combinación de tampones y disolventes adecuados para la reconstitución; se puede usar cualquier tampón en concreto. Sin embargo, suele ser deseable que el agente activo sea suficientemente estable en la solución y que el uno o varios tampones o disolventes usados sean suficientemente bien tolerados por los pacientes en soluciones para administrar a los pacientes. En el caso de ANG1005, debido a que el producto es menos estable a un pH superior a 6,0, en general, es deseable usar un sistema de reconstitución de disolvente/tampón que mantenga un pH por debajo de 6,0. Para ANG1005, un sistema de disolventes preferido es una combinación de etanol y solución lactato de Ringer/Dextrosa al 5 %. En este sistema, se añade etanol al vial que contiene el producto, se mezcla suavemente, y luego se añade solución de lactato de Ringer/Dextrosa al 5 % para disolver el producto. El uso de agua para inyección convencional (WFI) o solución salina como diluyentes produjo altos niveles de pH, conduciendo a la degradación de ANG1005. Tras la disolución, la mezcla se puede diluir además en agua u otros sistemas de tamponamiento. Las condiciones ilustrativas para la reconstitución del producto liofilizado se describen mejor más adelante, en el Ejemplo 4.

Composiciones de formulación

Como se ha descrito anteriormente, se han desarrollado formulaciones del agente hidrófobo ilustrativo, ANG1005, adecuado para la administración a pacientes. Antes de la liofilización, la formulación puede, en determinadas realizaciones, contener una proporción significativa de DMSO. Dichas composiciones pueden tener los siguientes componentes (p. ej., peso seco) como se muestra en las Tablas 8A y 8B. La Tabla 8C muestra concentraciones ilustrativas de los diversos componentes en solución acuosa antes de la liofilización.

Tabla 8A Porcentaje en peso sin incluir agua

Compuesto	Porcentaje (en peso)	Porcentajes preferidos	Porcentajes ilustrativos
ANG1005	0,1-5 %	1-3 %	1,8 %
Agente de tonicidad (p. ej., cloruro de sodio)	1-15 %	5-12 %	8,6 %
Tampón (p. ej., glicina)	1-10 %	3-7 %	4,5 %
Agente de carga (p. ej., manitol)	0-15 %	5-12 %	7,7 %
Solutol HS 15	40-75 %	50-70 %	61,1 %
DMSO	3-20 %	10-20 %	16,3 %

Tabla 8B Porcentaje en solución acuosa (preliofilización)

Compuesto	Porcentaje (en peso)	Porcentajes preferidos	Porcentajes más preferidos	Porcentajes ilustrativos
ANG1005	0,05-1,5 %	0,1-1,0 %	0,2-0,8 %	0,55 %
Agente de tonicidad (p. ej., cloruro de sodio)	0,1-10 %	0,5-6 %	1-3 %	2,7 %
Tampón (p. ej., glicina)	0,05-5 %	0,1-4 %	0,5-1,5 %	1,4 %
Agente de carga (p. ej., manitol)	0-5 %	0,2-4 %	1,0-3,0 %	2,4 %
Solutol HS 15	1-40 %	3-30 %	10-25 %	19,0 %
DMSO	0,5-15 %	1-10 %	2-8 %	5,0 %
Agua	25-85 %	50-80 %	65-75 %	69,0 %

Tabla 8C: Concentraciones (mg/ml) de solución acuosa previa a la liofilización

Compuesto	Concentración (mg/ml)	Concentraciones preferidas	Concentraciones más preferidas	Concentraciones ilustrativas
ANG1005	0,1-10,0	2-7	4-6,5	6,0
Agente de tonicidad (p. ej., cloruro de sodio)	5-200	10-100	10-50	29
Tampón (p. ej., glicina)	1-200	3-100	5-25	15
Agente de carga (p. ej., manitol)	0-100	2-50	5-35	26
Solutol HS 15	10-400	20-300	50-250	206
DMSO	1-200	15-200	30-100	55

- 5 La composición se diluye normalmente en agua antes de la liofilización (véase más abajo con respecto a las condiciones de liofilización). Para la mayoría de las aplicaciones clínicas, la solución se divide en cantidades apropiadas para la administración de monodosis de ANG1005 (p. ej., aproximadamente 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 200, 240, 300, 400 o 500 mg). Tras la liofilización (p. ej., en las condiciones descritas en la presente memoria), la concentración de DMSO se puede reducir significativamente. Tras la liofilización, una composición de ANG1005 de la invención puede tener las siguientes características (p. ej., peso seco) como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9

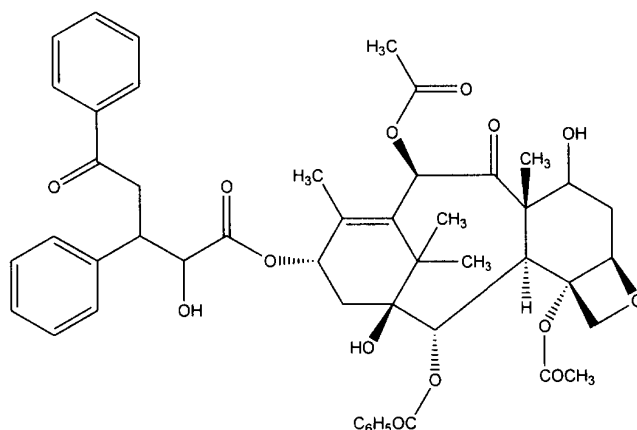
Compuesto	Porcentaje (en peso) (descrito)	Porcentajes preferidos (descritos)	Porcentajes más preferidos	Porcentajes ilustrativos (DMSO al 0,5 %)
ANG1005	0,1-5 %	1,5-3 %	1,8-2,3 %	2,11
Agente de tonicidad (p. ej., cloruro de sodio)	0-15 %	0-12 %	9-11 %	10,18
Tampón (p. ej., glicina)	1-10 %	3-7 %	4,5-6 %	5,27
Agente de carga (p. ej., manitol)	0-15 %	5-12 %	8-10 %	9,13
Solutol HS 15	40-75 %	50-70 %	69-75 %	72,32
DMSO	0,01-10 %	0,1-5 %	0,2-0,5	0,50

10 Agentes hidrófobos

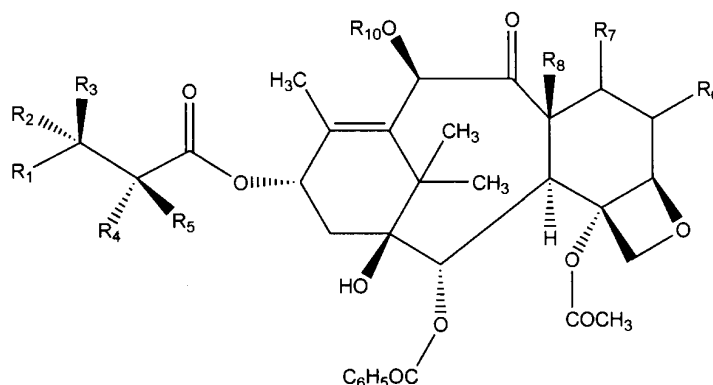
Se describe que es posible usar cualquier agente hidrófobo en las composiciones y los métodos. Los compuestos ilustrativos se describen a continuación.

Paclitaxel y compuestos relacionados

- 15 La invención se refiere a una composición liofilizada que comprende ANG1005, un conjugado de AngioPep2-paclitaxel. se describe que las formulaciones descritas en la presente memoria pueden usarse con paclitaxel, análogos de paclitaxel o conjugados de los mismos. El Paclitaxel tiene la fórmula:



Los análogos estructurales del paclitaxel se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.911.549, y se pueden describir mediante la fórmula:



- 5 en donde R_1 se selecciona del grupo que consiste en $-CH_3$; $-C_6H_5$, o fenilo sustituido con un, 2 o 3 alquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_3 , halo, alquiltio C_1-C_3 , trifluorometilo, C_2-C_6 , dialquilamino, hidroxilo o nitro; y -2 -furilo, 2 -tienilo, 1 -naftilo, 2 -naftilo o $3,4$ -metilendioxfenilo; R_2 se selecciona del grupo que consiste en $-H$, $-NHC(O)H$, $-NHC(O)$ -alquilo C_1-C_{10} (preferiblemente, $-NHC(O)$ -alquilo C_4-C_6), $-NHC(O)$ fenilo, $-NHC(O)$ fenilo sustituido con un, 2 o 3 alquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_3 , halo, alquiltio C_1-C_3 , trifluorometilo, dialquilamino C_2-C_6 , hidroxilo o nitro, $-NHC(O)C(CH_3)=CHCH_3$, $-NHC(O)OC(CH_3)_3$, $-NHC(O)OCH_2$ -fenilo, $-NH_2$, $-NHSO_2$ -4-metilfenilo, $-NHC(O)(CH_2)_3COOH$, $-NHC(O)$ -4-(SO_3H)fenilo, $-OH$, $-NHC(O)$ -1-adamantilo, $-NHC(O)O_3$ -tetrahidrofuranilo, $-NHC(O)O$ -4-tetrahidropiranilo, $-NHC(O)CH_2C(CH_3)_3$, $-NHC(O)C(CH_3)_3$, $-NHC(O)O$ -alquilo C_1-C_{10} , $-NHC(O)NH$ -alquilo C_1-C_{10} , $-NHC(O)NHPH$, $-NHC(O)NHPH$ sustituido con un, 2 o 3 alquilo C_1-C_4 , alcoxi C_1-C_3 , halo, alquiltio C_1-C_3 , trifluorometilo, dialquilamino C_2-C_6 o nitro, $-NHC(O)$ -cicloalquilo C_3-C_8 , $-NHC(O)C(CH_2CH_3)_2CH_3$, $-NHC(O)C(CH_3)_2CH_2Cl$, $-NHC(O)C(CH_3)_2CH_2CH_3$, ftalimido, $-NHC(O)$ -1-fenil-1-ciclopentilo, $-NHC(O)$ -1-metil-1-ciclohexilo, $-NHC(S)NHC(CH_3)_3$, $-NHC(O)NHCC(CH_3)_3$ o $-NHC(O)NHPH$; R_3 se selecciona del grupo que consiste en $-H$, $-NHC(O)$ fenilo o $-NHC(O)OC(CH_3)_3$, con la condición general de que uno de R_2 y R_3 sea $-H$, pero R_2 y R_3 no sean ambos $-H$; R_4 es $-H$ o se selecciona del grupo que consiste en $-OH$, $-OAc$ ($-OC(O)CH_3$), $-OC(O)OCH_2$ $C(Cl)_3$, $-OCOCH_2$ CH_2 NH_3^+ $HCOO^-$, $-NHC(O)$ fenilo, $-NHC(O)OC(CH_3)_3$, $-OCOCH_2CH_2COOH$ y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, $-OCO(CH_2)_3COOH$ y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y $-OC(O)-Z-C(O)-R'$ [en donde Z es etileno ($-CH_2CH_2-$), propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$), $-CH=CH-$, 1,2-ciclohexano o 1,2-fenileno, R' es $-OH$, base de $-OH$, $-NR'_2R'_3$, $-OR'_3$, $-SR'_3$, $-OCH_2C(O)NR'_4R'_5$ en donde R'_2 es $-H$ o $-CH_3$, R'_3 es $-(CH_2)_nNR'_6R'_7$ o $(CH_2)_nR'_6R'_7R'_8X$, en donde n es 1-3, R'_4 es $-H$ o alquilo C_1-C_4 , R'_5 es $-H$, alquilo C_1-C_4 , bencilo, hidroxietilo, $-CH_2CO_2H$ o dimetilaminoetilo, R'_6 y R'_7 son $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, bencilo o R'_6 y R'_7 junto con el nitrógeno de $NR'_6R'_7$ forman un grupo pirrolidino, piperidino, morfolino o N -metilpiperizino; R'_8 es $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ o bencilo, X es haluro y base es NH_3 , $(HOC_2H_4)_3N$, $N(CH_3)_3$, $CH_3N(C_2H_4)_2NH$, $NH_2(CH_2)_6NH_2$, N -metilglucamina, $NaOH$ o KOH], $-OC(O)(CH_2)_nNR^2R^3$ [en donde n es 1-3, R^2 es $-H$ o alquilo C_1-C_3 y R^3 es $-H$ o alquilo C_1-C_3], $-OC(O)CH(R'')NH_2$ [en donde R'' se selecciona del grupo que consiste en $-H$, $-CH_3$, $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2$ -fenilo, $-(CH_2)_4NH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$], el resto del aminoácido prolina, $-OC(O)CH=CH_2$, $-C(O)CH_2CH_2C(O)NHCH_2CH_2SO_3^-Y^+$, $-OC(O)CH_2CH_2C(O)NHCH_2CH_2CH_2SO_3^-Y^+$, en donde Y^+ es Na^+ o $N^+(Bu)_4$, $-OC(O)CH_2CH_2C(O)OCH_2CH_2OH$; R_5 es $-H$ o $-OH$, con la condición general de que en donde R_5 sea $-OH$, R_4 sea $-H$ y con la condición adicional de que en donde R_5 sea $-H$, R_4 no sea $-H$; R_6 es $-H$; $-H$, en donde R_7 es α - R_{71} : β - R_{72} , en donde uno de R_{71} y R_{72} es $-H$ y el otro de R_{71} y R_{72} es $-X$, en donde X es halo y R_8 es $-CH_3$; R_6 es $-H$; $-H$, en donde R_7 es α - H : β - R_{74} , en donde R_{74} y R_8 se toman conjuntamente para formar un anillo de ciclopropilo; R_{10} es $-H$ o $-C(O)CH_3$; y sus sales farmacéuticamente aceptables cuando el compuesto contiene un grupo funcional bien ácido o básico.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

Los análogos de paclitaxel particulares incluyen ((azidofenil)ureido)taxoide, (2 α ,5 α ,7 β ,9 α , 10 β , 13 α)-5,10,13,20-tetraacetoxitax-11-en-2,7,9-triol, (2 α ,5 α ,9 α , 10 β)-2,9,10-triacetoxi-5-((β -D-glucopiranosil)oxi)-3,11 ciclotax-11-en-13-ona, 1 β -hidroxibacatina I, 1,7-dihidroxitaxinina, 1-aceti-5,7,10-deacetil-bacatina I, 1-deshidroxibacatina VI, 1-hidroxi-2-desacetoxi-5-descinnamoil-taxinina j, 1-hidroxi-7,9-didesacetilbacatina I, 1-hidroxibacatina I, 10-acetil-4-desacetiltaxotere, 10-desacetoxipaclitaxel, disolvato de dimetilsulfóxido de 10-desacetil-bacatina III, 10-desacetil-10-(3-aminobenzoil)paclitaxel, 10-desacetil-10-(7-(dietilamino)cumarin-3-carbonil)paclitaxel, 10-desacetil-9-dihidrotaxol, 10-desacetilbacatina III, 10-desacetilpaclitaxel, 10-desacetiltaxinina, 10-desacetiltaxol, 10-desoxi-10-C-morfolinoetil-docetaxel, 10-O-acetil-2-O-(ciclohexilcarbonil)-2-debenzoiltaxotere, 10-O-sec-aminoetil-docetaxel, 11-desmetil-laulimalida, 13-desoxo-13-acetiloxi-7,9-diacetil-1,2-didesoxitaxina, 13-desoxibacatina III, 14-hidroxi-10-desacetil-2-O-debenzoilbacatina III, 14-hidroxi-10-desacetilbacatina III, 14 β -benzoiloxi-13-desacetilbacatina IV, 14 β -benzoiloxi-2-desacetilbacatina VI, 14 β -benzoiloxibacatina IV, 19-hidroxibacatina III, 2',2''-metilendocetaxel, 2',2''-metilenaclitaxel, 2'-(valil-leucil-lisil-PABC)paclitaxel, 2'-acetiltaxol, 2'-O-acetil-7-O-(*N*-(4'-fluoresceincarbonil)alanil)taxol, 2,10,13-triacetoxi-taxa-4(20), 11-dien-5,7,9-triol, 2,20-O-diacetiltaxumairol N, 2-(4-azidobenzoil)taxol, 2-desacetoxitaxinina J, 1,14-Carbonato de 2-debenzoil-2-m-metoxibenocil-7-trietililil-13-oxo-14-hidroxibacatina III, 13-O-(*N*-(ciclohexilcarbonil)-3-ciclohexilisoserinato) de 2-O-(ciclohexilcarbonil)-2-debenzoilbacatina III, 2 α , 7 β ,9 α ,10 β ,13 α -pentaacetoxitaxa-4 (20), 11-dien-5-ol, 2 α ,5 α ,7 β ,9 α ,13 α -penta-hidroxi-10 β -acetoxitaxa-4(20), 11-dieno, 2 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13-pentaacetoxi-11 β -hidroxi-5 α -(3'-*N,N*-dimetilamino-3'-fenil)-propioniloxitaxa-4(20),12-dieno, 2 α ,7 β -diacetoxi-5 α , 10 β , 13 β -trihidroxi-2(3-20)abeotaxa-4(20), 11 dien-9-ona, 2 α ,9 α -dihidroxi-10 β , 13 α -diacetoxi-5 α -(3'-metilamino-3'-fenil)-propioniloxitaxa-4(20), 11-dieno, 2 α -hidroxi-7 β ,9 α ,10 β ,13 α -tetraacetoxi-5 α -(2'-hidroxi-3'-*N,N*-dimetilamino-3'-fenil)-propioniloxitaxa-4(20), 11-dieno, 3'-(4-azidobenzamido)taxol, 3'-*N*-(4-benzoildihidrocinnamoil)-3'-*N*-debenzoilpaclitaxel, 3'-*N-m*-aminobenzamido-3'-debenzamidopaclitaxel, 3'-*p*-hidroxipaclitaxel, *N,N*-2, 4-deacetiltaxol de 3,11-ciclotaxinina, 5,13 -diacetoxi-taxa-4(20),11-dien-9,10-diol, taxinina K 5-O-benzolada, 5-O-fenilpropioniloxitaxinina A, 5 α ,13 α -diacetoxi-10 β -cinnamoiloxi-4(20),11-taxadien-9 α -ol, 6,3'-*p*-dihidroxipaclitaxel, 6- α -hidroxi-7-desoxi-10-desacetilbacatina-III, 6-fluoro-10-acetildocetaxel, 6-hidroxitaxol, 7,13-diacetoxi-5-cinnamiloxi-2(3-20)-abeo-taxa-4(20),11-dien-2,10-diol, 7,9-didesacetilbacatina VI, 7-(5'-Biotinilamidopropanoil)paclitaxel, 7-acetiltaxol, 7-desoxi-10-desacetilbacatina-III, 7-desoxi-9-dihidropaclitaxel, 7-epipaclitaxel, 7-metilmetilpaclitaxel, 7-O-(4-benzoildihidrocinnamoil)paclitaxel, 7-O-(*N*-(4'-fluoresceincarbonil)alanil)taxol, 7-xilosil-10-desacetiltaxol, 8,9-mono-epoxi-brevifolina, 9-dihidrobacatina III, 9-dihidrotaxol, 9 α -hidroxi-2 α ,10 β ,13 α -triacetoxi-5 α -(3'-*N,N*-dimetilamino-3'-fenil)-propioniloxitaxa-4(20), 11-dieno, bacatina III, 13-O-(*N*-benzoil-3-ciclohexil-isoserinato) de bacatina III, BAY59, benzoiltaxol, BMS 181339, BMS 185660, BMS 188797, brevifoliol, butitaxel, cefalomanina, dantaxusina A, dantaxusina B, dantaxusina C, dantaxusina D, dibromo-10-desacetilcefalomanina, DJ927, docetaxel, Flutax 2, glucuronida de glutarilpaclitaxel-6-aminohexanol, IDN 5109, IDN 5111, IDN 5127, IDN 5390, isolaulimalida, laulimalida, MST 997, *N*-(paclitaxel-2'-O-(2-amino)fenilpropionato)-O-(β -glucuronil)carbarnato, *N*-(paclitaxel-2'-O-3,3-dimetil-butanoato)-O-(β -glucuronil)carbarnato, *N*-debenzoil-*N*-(3-(dimetilamino)benzoil)paclitaxel, nonataxel, paclitaxel conjugado con octreotida, Paclitaxel, paclitaxel-transferrina, PNU 166945, paclitaxel-2'-glicinato conjugado con poli(etilenglicol), ácido poliglucámico-paclitaxel, protaxel, RPR 109881A, SB T-101187, SB T-1102, SB T-1213, SB T-1214, SB T-1250, SB T-12843, tasumatrol E, tasumatrol F, tasumatrol G, acetato de taxa-4(20),11(12)-dien-5-ilo, taxa-4(20),11(12)-dien-5-ol, taxano, taxquinina N, taxcultina, taxezopidina M, taxezopidina N, taxina, taxinina, taxinina A, taxinina M, taxinina NN-1, taxinina NN-7, taxol C-7-xilosa, conjugado de taxol-sialilo, taxumairol A, taxumairol B, taxumairol G, taxumairol H, taxumairol I, taxumairol K, taxumairol M, taxumairol N, taxumairol O, taxumairol U, taxumairol V, taxumairol W, taxumairol-X, taxumairol-Y, taxumairol-Z, taxusina, taxuspinanano A, taxuspinanano B, taxuspina C, taxuspina D, taxuspina F, taxuyunanina C, taxuyunanina S, taxuyunanina T, taxuyunanina U, taxuyunanina V, tRA-96023 y wallifoliol. Otros análogos de paclitaxel incluyen 1-deoxipaclitaxel, 10-desacetoxi-7-desoxipaclitaxel, 10-O-desacetilpaclitaxel 10-monosucciniléster, 10-succinil-paclitaxel, 3-(*terc*-butiloxicarbonil)amino-2-hidroxi-5-metil-4-hexaenoato de 12b-acetiloxi-2 α ,3,4,4 α ,5,6,9,10,11,12,12 α ,12b-dodecahidro-4,11-dihidroxi-12-(2,5-dimetoxibenciloxi)-4 α ,8,13,13-tetrametil-5-oxo-7,11-metano-1*H*-ciclododeca(3,4)benz(1,2-b)oxet-9-ilo, paclitaxel unido a 130-nm-albúmina, 2'-paclitaxel-metil-2-glucopiranosil-succinato, 3'-(4-azidofenil)-3'-defenilpaclitaxel, 4-fluoropaclitaxel, 4-(*N*-acetil-3-fenilisoserinato) de 6,6,8-trimetil-4,4 α ,5,6,7,7 α ,8,9-octahidrociclopenta(4,5)ciclohepta(1,2-c)-furan-4,8-diol, 4-(*N-terc*-butoxicarbonil-3-fenilisoserinato) de 6,6,8-trimetil-4,4 α ,5,6,7,7 α ,8,9-octahidrociclopenta(4,5)ciclohepta(1,2-c)-furan-4,8-diol, 7-(3-metil-3-nitrosotiobutiril)paclitaxel, 7-desoxipaclitaxel, 7-succinilpaclitaxel, A-Z-CINN 310, AI-850, Paclitaxel unido a albúmina, AZ 10992, isotaxel, MAC321, MBT-0206, NK105, Paclix, paclitaxel poliglumex, conjugado de paclitaxel-EC-1, polilactofato y TXD 258. Otros análogos de paclitaxel se describen en las patentes de EE.UU. n.º 4.814.470, 4.857.653, 4.942.184, 4.924.011, 4.924.012, 4.960.790; 5.015.744; 5.157.049; 5.059.699; 5.136.060; 4.876.399; y 5.227.400.

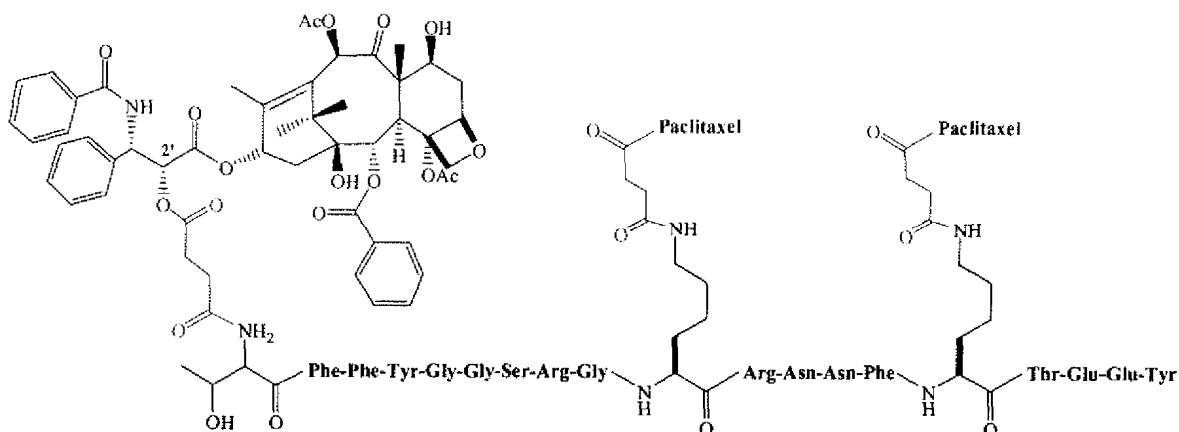
55 Otros agentes hidrófobos

Otros agentes hidrófobos incluyen analgésicos y agentes antiinflamatorios (p. ej., aloxiprina, auranofina, azapropazona, benorilato, difunisal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac), antihelmínticos (p. ej., albendazol, hidroxinaftoato de befenio, cambendazol, diclorofeno, ivermectina, mebendazol, oxamniquina, oxfendazol, embonato de oxantel, praziquantel, embonato de pirantel, tiabendazol), agentes antiaritmicos (p. ej., HCl de amiodarona, disopiramide, acetato de flecainida, sulfato de quinidina, agentes antibacterianos (p. ej., penicilina de benetamina, cinoxacina, HCl de ciprofloxacina, claritromicina, clofazimina, cloxacilina, demeclociclina, doxiciclina, eritromicina, etionamida, imipenem, ácido nalidíxico, nitrofurantoina, rifampicina, espiramicina, sulfabenzamida, sulfadoxina, sulfamerazina, sulfacetamida, sulfadiazina,

sulfafurazol, sulfametoxazol, sulfapiridina, tetraciclina, timetoprim), anticoagulantes (p. ej., dicoumarol, dipiridamol, nicoumalona, fenindiona), antidepresivos (por ejemplo, amoxapina, HCl de maprotilina, HCl de mianserina, HCl de nortriptilina, HCl de trazodona, maleato de trimipramina), Antidiabéticos (p. ej., acetohehexamida, clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida, tolazamida, tolbutamida), antiepilépticos (p. ej., beclamida, carbamazepina, clonazepam, etotoína, metoína, metsuximida, metilfenobarbitona, oxcarbapentina, parametadiona, fenacemida, fenobarbitona, fenitoína, fensuximida, primidona, sultiame, ácido valproico), agentes antifúngicos (p. ej., anfotericina, nitrato de butoconazol, clotrimazol, nitrato de econazol, fluconazol, flucitosina, griseofulvina, itraconazol, ketoconazol, miconazol, natamicina, nistatina, nitrato de sulconazol, HCl de terbinafina, terconazol, tioconazol, ácido undecenoico), agentes antigota (p. ej., alopurinol, probenecid, sulfina-pirazona), agentes antihipertensivos (p. ej., amlodipina, benidipina, darodipina, HCl de diltiazem, diazoxida, felodipina, acetato de guanabenz, isradipina, minoxidil, HCl de nicardipina, nifedipina, nimodipina, HCl de fenoxibenzamina, HCl de prazosina, reserpina, HCl de terazosina), antimaláricos (p. ej., amodiaquina, cloroquina, HCl de clorproguanil, HCl de halofantrina, HCl de mefloquina, HCl de proguanil, pirimetamina, sulfato de quinina), agentes antimigraña (p. ej., mesilato de dihidroergotamina, tartrato de ergotamina, maleato de metilsergida, maleato de pizotifeno, succinato de sumatriptán), agentes antimuscarínicos (p. ej., atropina, HCl de benzhexol, biperideno, HCl de etopropazina, hiosciamina, Bromuro de mepenzolato, HCl de oxifencilimina, tropicamida), agentes antineoplásicos e inmunosupresores (p. ej., aminoglutetimida, amsacrina, azatioprina, busulfán, clorambucil, ciclosporina, dacarbazina, estramustina, etopósido, lomustina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitozantrona, HCl de procarbazona, citrato de tamoxifén, testolactona), agentes antiprotzoarios (p. ej., benznidazol, clioquinol, decoquinato, diiodohidroxiquinolina, furoato de diloxanida, dinitolmida, furzolidona, metronidazol, nimorazol, nitrofurazona, ornidazol, tinidazol), agentes antitiroideos (p. ej., carbimazol, propiltiouracilo), ansiolítico, sedantes, hipnóticos y neurolépticos (p. ej., alprazolam, amilobarbitona, barbitalona, benzazepam, bromazepam, bromperidol, brotizolam, butobarbitona, carbromal, clordiazepóxido, clormetiazol, clorpromazina, clobazam, clonazepam, clozapina, diazepam, droperidol, etinamato, flunanisona, flunitrazepam, fluopromazina, decanoato de flupentixol, decanoato de flufenazina, flurazepam, haloperidol, lorazepam, lormetazepam, medazepam, meprobamato, metacualona, midazolam, nitrazepam, oxazepam, pentobarbitona, pimozida de perfenazina, proclorperazina, sulpirida, temazepam, tioridazina, triazolam, zopiclona), β -bloqueantes (p. ej., acebutolol, alprenolol, atenolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol, propranolol), agentes inotrópicos cardíacos (p. ej., amrinona, digitoxina, digoxina, enoximona, lanatosida C, medigoxina), corticosteroides (p. ej., beclometasona, betametasona, budesonida, acetato de cortisona, desoximetasona, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, flucortolona, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), diuréticos: acetazolamida, amilorida, bendrofluazida, bumetanida, clortiazida, clortalidona, ácido etacrínico, frusemida, metolazona, espironolactona, triamtereno), agentes antiparkinsonianos (p. ej., mesilato de bromocriptina, maleato de lisurida), agentes gastrointestinales (p. ej., bisacodil, cimetidina, cisaprida, HCl de difenoxilato, domperidona, famotidina, loperamida, mesalazina, nizatidina, omeprazol, HCl de ondansetrona, HCl de ranitidina, sulfasalazina), antagonistas del receptor de histamina H (p. ej., acrivastina, astemizol, cinarizina, ciclizina, HCl de ciproheptadina, dimenhidrinato, HCl de flunarizina, loratadina, HCl de meclozina, oxatomida, terfenadina), agentes reguladores de lípidos (p. ej., bezafibrato, clofibrato, fenofibrato, gemfibrozil, probucol), nitratos y otros agentes antiangiogénicos (p. ej., nitrato de amilo, trinitrato de glicerilo, dinitrato de isosorbida, mononitrato de isosorbida, tetranitrato de pentaeritritol), analgésicos opioides (p. ej., codeína, dextropropioxi-feno, diamorfina, dihidrocodeína, meptazinol, metadona, morfina, nalbufina, pentazocina), hormonas sexuales (p. ej., citrato de clomifeno, danazol, etinil-estradiol, acetato de medroxi-progesterona, mestranol, metilttestosterona, noretiesterona, norgestrel, estradiol, oestrógenos conjugados, progesterona, estanozolol, estibestrol, testosterona, tibolona) y estimulantes (p. ej., anfetamina, dexamfetamina, dexfenfluramina, fenfluramina, mazindol).

Conjugados de polipéptidos

Los conjugados que incluyen un agente activo y un polipéptido pueden usarse en la formulación descrita en la presente memoria. Como se describe en las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU. n.º 2006/0182684 y 2006/0189515, y la solicitud provisional de los EE.UU. n.º 61/008.880, presentada el jueves, 20 de diciembre de 2007, se han desarrollado conjugados de polipéptido-agente. Dichos conjugados pueden incluir cualquier polipéptido descrito en la presente memoria, un agente hidrófobo tal como paclitaxel o un análogo de paclitaxel (p. ej., los descritos en la presente memoria) y un enlazador (p. ej., los descritos en la presente memoria). Los conjugados de paclitaxel se ilustran mediante ANG1005, que incluye el péptido AngioPep-2 (SEQ ID NO: 97) conjugado a tres moléculas de paclitaxel a través de enlaces éster en el extremo N, y a través de lisinas en las posiciones 10 y 15. La estructura del ANG1005 es:



Los conjugados, en determinadas realizaciones, pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) o pueden dirigirse preferiblemente a ciertos tipos de células, tales como células del hígado, pulmón, riñón, musculares o pueden dirigirse a células tumorales (de cualquier tipo de célula descrito en la presente memoria). Estos agentes conjugados con estos péptidos pueden presentar una mayor captación en las células diana, por ejemplo, mediante endocitosis mediada por receptor (p. ej., a través de un receptor de LRP). Los agentes conjugados pueden, bien como alternativa o además, presentar una mayor estabilidad o una expulsión reducida de la célula (p. ej., debido al flujo mediado por la glicoproteína P).

Polipéptidos

Se describe que las composiciones y los métodos pueden incluir cualquier polipéptido descrito en la presente memoria, por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos descritos en la Tabla 10 (p. ej., un polipéptido definido en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-105 y 107-112, tales como SEQ ID NO: 1-97, 99, 100, 101 o 107-112), o cualquier fragmento, análogo, derivado o variante del mismo. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede tener al menos un 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o incluso 100 % de identidad con un polipéptido descrito en la presente memoria. El polipéptido puede tener una o más sustituciones (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) con respecto a una de las secuencias descritas en la presente memoria. Otras modificaciones se describen con mayor detalle más adelante.

También se describen fragmentos de estos polipéptidos (p. ej., un fragmento funcional). En determinadas realizaciones, los fragmentos pueden entrar o acumularse en un tipo de célula particular (p. ej., hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo) o pueden atravesar la BHE. Los truncamientos del polipéptido pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más aminoácidos bien del extremo N del polipéptido, del extremo C del polipéptido, o de una combinación de los mismos. Otros fragmentos incluyen secuencias en donde se eliminan partes internas del polipéptido.

Se pueden identificar polipéptidos adicionales usando uno de los ensayos o métodos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006/0189515 o mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede producir un vector candidato mediante síntesis de polipéptidos convencionales, conjugarse con Taxol y administrarse a un animal de laboratorio. Se puede identificar un vector biológicamente activo, por ejemplo, Basándose en su eficacia para aumentar la supervivencia de un animal inyectado con células tumorales, y tratado con el conjugado en comparación con un control que no haya sido tratado con un conjugado (p. ej., tratado con el agente no conjugado).

En otro ejemplo, se puede identificar un polipéptido biológicamente activo en función de su ubicación en el parénquima en un ensayo de perfusión cerebral *in situ*. Se pueden usar ensayos de BHE *in vitro*, tales como el modelo desarrollado por CELLIAL™ Technologies, para identificar dichos vectores.

También se pueden realizar ensayos para determinar la acumulación en otros tejidos. Se pueden administrar conjugados marcados de un polipéptido a un animal y se puede medir la acumulación en diferentes órganos. Por ejemplo, un polipéptido conjugado con un marcador detectable (p. ej., un marcador de espectroscopia de fluorescencia de infrarrojo cercano, tal como Cy5.5) permite la visualización *in vivo* de organismos vivos. Dicho polipéptido se puede administrar a un animal, y se puede detectar la presencia del polipéptido en un órgano, permitiendo así la determinación de la velocidad y la cantidad de acumulación del polipéptido en el órgano deseado. En otras realizaciones, el polipéptido se puede marcar con un isótopo radiactivo (p. ej., ¹²⁵I). El polipéptido se administra a un animal. Tras un período de tiempo, el animal se sacrifica y se extraen los órganos del animal. La cantidad de radioisótopo de cada órgano se puede medir usando cualquier medio conocido en la técnica. Al comparar la cantidad de un polipéptido candidato marcado en un determinado órgano sin la cantidad de control marcado, se puede determinar la capacidad del polipéptido candidato, la velocidad o la cantidad de acumulación de un polipéptido candidato en un determinado tejido. Los controles negativos apropiados incluyen cualquier polipéptido conocido que no se transporte a un tipo de célula particular.

TABLA 10

SEQ ID NO:

1	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D
2	T	F	Q	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	T	E	K	E
3	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y
4	S	F	Y	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	E
5	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
6	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
7	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	Y	K	R	A	K	Y
8	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
9	T	F	Q	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
10	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
11	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
12	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
13	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
14	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	Y	K	R	A	K	Y

SEQ ID NO:

15 P F F Y G G C R G K R N N F L R A K Y
 16 T F F Y G G C R G K R N N F K R E K Y
 17 P F F Y G G C R A K K N N F K R A K E
 18 T F F Y G G C R G K R N N F K R A K D
 19 T F F Y G G C R A K R N N F D R A K Y
 20 T F F Y G G C R G K K N N F K R A E Y
 21 P F F Y G G C G A N R N N F K R A K Y
 22 T F F Y G G C G G K K N N F K T A K Y
 23 T F F Y G G C R G N R N N F L R A K Y
 24 T F F Y G G C R G N R N N F K T A K Y
 25 T F F Y G G S R G N R N N F K T A K Y
 26 T F F Y G G C L G N G N N F K R A K Y
 27 T F F Y G G C L G N R N N F L R A K Y
 28 T F F Y G G C L G N R N N F K T A K Y
 29 T F F Y G G C R G N G N N F K S A K Y
 30 T F F Y G G C R G K K N N F D R E K Y
 31 T F F Y G G C R G K R N N F L R E K E
 32 T F F Y G G C R G K G N N F D R A K Y
 33 T F F Y G G S R G K G N N F D R A K Y
 34 T F F Y G G C R G N G N N F V T A K Y
 35 P F F Y G G C G G K G N N Y V T A K Y
 36 T F F Y G G C L G K G N N F L T A K Y
 37 S F F Y G G C L G N K N N F L T A K Y
 38 T F F Y G G C G G N K N N F V R E K Y
 39 T F F Y G G C M G N K N N F V R E K Y
 40 T F F Y G G S M G N K N N F V R E K Y
 41 P F F Y G G C L G N R N N Y V R E K Y

ES 2 721 148 T3

42 T F F Y G G C L G N R N N F V R E K Y
43 T F F Y G G C L G N K N N Y V R E K Y
44 T F F Y G G C G G N G N N F L T A K Y
45 T F F Y G G C R G N R N N F L T A E Y
46 T F F Y G G C R G N G N N F K S A E Y
47 P F F Y G G C L G N K N N F K T A E Y
48 T F F Y G G C R G N R N N F K T E E Y
49 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E D

SEQ ID NO:

50 P F F Y G G C G G N G N N F V R E K Y
51 S F F Y G G C M G N G N N F V R E K Y
52 P F F Y G G C G G N G N N F L R E K Y
53 T F F Y G G C L G N G N N F V R E K Y
54 S F F Y G G C L G N G N N Y L R E K Y
55 T F F Y G G S L G N G N N F V R E K Y
56 T F F Y G G C R G N G N N F V T A E Y
57 T F F Y G G C L G K G N N F V S A E Y
58 T F F Y G G C L G N R N N F D R A E Y
59 T F F Y G G C L G N R N N F L R E E Y
60 T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y
61 P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y
62 P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y
63 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
64 A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G
65 Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G
66 P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y
67 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
68 K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
69 T F Y Y G G C R G K R N N Y K T E E Y
70 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
71 C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y
72 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C
73 C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y
74 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C

ES 2 721 148 T3

75 P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
76 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y
77 T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y
78 T F F Y G G C R G K R N N F K T K R Y
79 T F F Y G G K R G K R N N F K T A E Y
80 T F F Y G G K R G K R N N F K T A G Y
81 T F F Y G G K R G K R N N F K R E K Y
82 T F F Y G G K R G K R N N F K R A K Y
83 T F F Y G G C L G N R N N F K T E E Y
84 T F F Y G C G R G K R N N F K T E E Y
85 T F F Y G G R C G K R N N F K T E E Y
86 T F F Y G G C L G N G N N F D T E E E
87 T F Q Y G G C R G K R N N F K T E E Y

SEQ ID NO:

88 Y N K E F G T F N T K G C E R G Y R F
89 R F K Y G G C L G N M N N F E T L E E
90 R F K Y G G C L G N K N N F L R L K Y
91 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y
92 K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F K N Y
93 K T K R K R K K Q R V K I A Y
94 R G G R L S Y S R R F S T S T G R
95 R R L S Y S R R R F
96 R Q I K I W F Q N R R M K W K K
97 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
98 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G
C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A

99 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y
100 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y
101 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y
102 N A K A G L C Q T F V Y G G C L A K R N N F
E S A E D C M R T C G G A

103 Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G
G A

104 G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E

105 L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A

107 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

108 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

109 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

110 R F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y

111 T F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y

112 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y

113 C T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y

114 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C

115 C T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y

116 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y C

El péptido n.º 5 incluye la secuencia de SEQ ID NO: 5 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 1).

El péptido n.º 67 incluye la secuencia de SEQ ID NO: 67 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 1).

- 5 El péptido n.º 76 incluye la secuencia de SEQ ID NO: 76 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 1).

El péptido n.º 91 incluye la secuencia de SEQ ID NO: 91 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 1).

El péptido n.º 107 incluye la secuencia de SEQ ID NO: 97 y está acetilado en su extremo N.

- 10 El péptido n.º 109 incluye la secuencia de SEQ ID NO: 109 y está acetilado en su extremo N.

El péptido n.º 110 incluye la secuencia de SEQ ID NO: 110 y está acetilado en su extremo N.

Los grupos amina de Angiopep-1 (SEQ ID NO: 67) y Angiopep-2 (SEQ ID NO: 97) se han usado como sitios para la conjugación de agentes. Para estudiar el papel de los grupos amina en la conjugación y su impacto en la capacidad de transporte global de estos vectores, se diseñaron nuevos vectores, basados en la secuencia de Angiopep-1 y Angiopep-2, con grupos de aminas reactivas variables y carga global variable. Estos polipéptidos se muestran en la Tabla 11.

- 15

Tabla 11: Vectores con dianas de grupo amina variables

Nombre del polipéptido	Secuencias polipeptídicas	Aminas reactivas (posiciones)	Carga	SEQ ID NO:
Angiopep-3*	Ac ¹ -TFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2(10,15)	+1	107
Angiopep-4b	RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	3(1,10,15)	+3	108
Angiopep-4a	Ac ¹ -RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2(10,15)	+2	109
Angiopep-5	Ac ¹ -RFFYGGSRGKRNNFRTEEY	1 (10)	+2	110
Angiopep-6	TFFYGGSRGKRNNFRTEEY	2(1,10)	+2	111
Angiopep-7	TFFYGGSRGRRNNFRTEEY	1(1)	+2	112

*Angiopep-3 es una forma acetilada de Angiopep-2.

¹Ac representa acetilación.

Polipéptidos modificados

Las composiciones y los métodos descritos también pueden incluir un polipéptido que tenga una modificación de una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria (p. ej., un polipéptido que tenga una secuencia descrita en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-105 y 107-116, tal como AngioPep-3, -4a, -4b, -5, -6 o -7). En determinadas realizaciones, la modificación no destruye significativamente una actividad biológica deseada. En algunas realizaciones, la modificación puede causar una reducción en la actividad biológica (p. ej., en al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 35 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % o 95 %). En otras realizaciones, la modificación no tiene efecto sobre la actividad biológica o puede aumentar (p. ej., en al menos un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % o 1.000 %) la actividad biológica del polipéptido original. El polipéptido modificado puede tener o puede optimizar una o más de las características de un polipéptido que, en algún caso, podrían ser necesarias o deseables. Dichas características incluyen estabilidad *in vivo*, biodisponibilidad, toxicidad, actividad inmunológica o identidad inmunológica.

Los polipéptidos descritos pueden incluir aminoácidos o secuencias modificadas mediante procesos naturales, tales como el procesamiento posterior a la traducción, o mediante técnicas de modificación química conocidas en la técnica. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte de un polipéptido, incluyendo la estructura principal del polipéptido, las cadenas laterales de aminoácidos y el extremo amino o carboxi. El mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios en un polipéptido dado, y un polipéptido puede contener más de un tipo de modificación. Los polipéptidos pueden ser ramificados como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales posteriores a la traducción o pueden fabricarse sintéticamente. Otras modificaciones incluyen pegilación, acetilación, acilación, adición del grupo acetomidometilo (Acm), ADP-ribosilación, alquilación, amidación, biotilación, carbamoilación, carboxietilación, esterificación, unión covalente a flavina, unión covalente a una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente del fármaco, unión covalente de un marcador (p. ej., fluorescente o radioactivo), unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente del fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación.

Un polipéptido modificado puede incluir además una inserción, supresión o sustitución de aminoácidos, ya sea conservativa o no conservativa (p. ej., D-aminoácidos, desaminoácidos) en la secuencia polipeptídica (p. ej., cuando dichos cambios no modifican sustancialmente la actividad biológica del polipéptido).

Las sustituciones pueden ser conservativas (es decir, en donde un resto se reemplaza por otro del mismo tipo o grupo general) o no conservativas (es decir, en donde un resto se reemplaza por un aminoácido de otro tipo). Además, se puede sustituir un aminoácido no natural por un aminoácido natural (es decir, una sustitución conservativa de aminoácidos no naturales o una sustitución no conservativa de aminoácidos no naturales).

Los polipéptidos fabricados sintéticamente pueden incluir sustituciones de aminoácidos no codificados de manera natural por el ADN (p. ej., aminoácidos no naturales). Los ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen D-aminoácidos, un aminoácido que tiene un grupo acetilaminometilo unido a un átomo de azufre de una cisteína, un aminoácido pegilado, aminoácidos omega de la fórmula $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, en donde n es 2-6, aminoácidos no polares neutros, tales como sarcosina, *t*-butilalanina, *t*-butilglicina, *N*-metilisoleucina y norleucina. La fenilglicina puede sustituir a Trp, Tyr o Phe; el sulfóxido de citrulina y metionina son neutros no polares, el ácido cisteico es ácido y la ornitina es básica. La prolina puede estar sustituida con hidroxiprolina y conservar las propiedades que confieren la conformación.

Los análogos pueden generarse mediante mutagénesis de sustitución y conservar la actividad biológica del polipéptido original. En la Tabla 12, se muestran ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservativas". Si dichas sustituciones producen un cambio no deseado, entonces se introduce otro tipo de sustituciones, denominadas "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 12, o como se describe además en la presente memoria en referencia a las clases de aminoácidos, se introducen y se exploran los productos.

Se realizan modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos según las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, metionina (Met), Alanina (Ala), Valina (Val), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), Histidina (His), Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe),

(2) hidrófilos neutros: Cisteína (Cys), Serina (Ser), Treonina (Thr)

(3) ácidos/cargados negativamente: Ácido aspártico (Asp), Ácido glutámico (Glu)

(4) básicos: Asparagina (Asn), Glutamina (Gln), Histidina (His), Lisina (Lys), Arginina (Arg)

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Glicina (Gly), Prolina (Pro);

(6) aromáticos: Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe), Histidina (His),

5 (7) polar: Ser, Thr, Asn, Gln

(8) básicos cargados positivamente: Arg, Lys, His y;

(9) cargados: Asp, Glu, Arg, Lys, His

En la Tabla 3, se enumeran otras sustituciones de aminoácidos conservativas.

Tabla 12: Sustitución de aminoácidos

Resto original	Sustitución ilustrativa	Sustitución conservativa
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Resto original	Sustitución ilustrativa	Sustitución conservativa
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

10 **Análogos adicionales**

Los polipéptidos y conjugados descritos pueden incluir análogos de polipéptidos de la aprotinina conocidos en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.807.980 describe inhibidores derivados del inhibidor de la tripsina pancreática bovina (aprotinina), así como un método para su preparación y uso terapéutico, incluyendo el polipéptido de la SEQ ID NO: 102. Estos polipéptidos se han usado para el tratamiento de una afección caracterizada por un aspecto o una cantidad anómalos de factor tisular y/o factor Villa, tal como la trombosis anormal. La patente de EE.UU. n.º 5.780.265 describe inhibidores de la serina proteasa capaces de inhibir la caliceína plasmática, incluyendo la SEQ ID NO: 103. La patente de EE.UU. n.º 5.118.668 describe variantes de inhibidor de la tripsina pancreática bovina,

15

incluyendo la SEQ ID NO: 105. La secuencia de aminoácidos de aprotinina (SEQ ID NO: 98), la secuencia de aminoácidos de Angiopep-1 (SEQ ID NO: 67) y la SEQ ID NO: 104, así como algunas secuencias de análogos biológicamente activos se pueden encontrar en la publicación de solicitud internacional n.º WO 2004/060403.

5 Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica un análogo de aprotinina se ilustra en SEQ ID NO: 106 (atgagaccag atttctgcct cgagccgccc tacactggc cctgcaaagc tcgtatcatc cgttactct acaatgcaa ggcaggcctg tgcagacct tcgtatacgg cggctgcaga gctaagcgta acaactcaa atccgcgaa gactgcatgc gtactgagg ttgtgcttag; n.º de referencia de GenBank X04666). Esta secuencia codifica una lisina en la posición 16 en lugar de una valina, como se encuentra en la SEQ ID NO: 98. Se puede introducir una mutación en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 106 mediante métodos conocidos en la técnica para cambiar el producto del polipéptido de SEQ ID NO: 98 que tiene una valina en la posición 16. Se pueden obtener mutaciones o fragmentos adicionales usando cualquier técnica conocida en la técnica.

10 Se pueden encontrar otros ejemplos de análogos de aprotinina al realizar un BLAST de proteínas (Genebank: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) usando la secuencia de aprotinina sintética (o parte de la misma) descrita en la solicitud internacional n.º PCT/CA2004/000011. Se encuentran análogos de aprotinina ilustrativos en los números de referencia CAA37967 (GI:58005) y 1405218C (GI:3604747).

Preparación de derivados polipeptídicos y peptidomiméticos

Además de los polipéptidos que solo consisten en aminoácidos naturales, también se pueden usar peptidomiméticos o análogos de polipéptidos. Los análogos de polipéptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no polipeptídicos con propiedades análogas a las del polipéptido de molde. Los compuestos no polipeptídicos se denominan "miméticos de polipéptidos" o peptidomiméticos (Fauchere *et al.*, *Infect. Immun.* 54:283-287,1986; Evans *et al.*, *J. Med. Chem.* 30:1229-1239, 1987). Se pueden usar miméticos de polipéptidos que están relacionados estructuralmente con polipéptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o potenciado. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares al polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como los polipéptidos de unión al receptor naturales, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por enlaces tales como -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, CH=CH - (*cis* y *trans*), -CH₂SO-, -CH(OH)CH₂-, -COCH₂- etc., mediante métodos bien conocidos en la técnica (Spatola, *Peptide Backbone Modifications, Vega Data*, 1(3):267, 1983); Spatola *et al.* (*Life Sci.* 38:1243-1249, 1986); Hudson *et al.* (*Int. J. Pept. Res.* 14:177-185, 1979); y Weinstein. B., 1983, "Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins", Weinstein eds, Marcel Dekker, Nueva York).

20 Dichos miméticos polipeptídicos pueden tener ventajas significativas frente a los polipéptidos naturales, incluyendo una producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (p. semivida, absorción, potencia, eficiencia), antigenicidad reducida y otros.

Si bien los polipéptidos pueden ser eficaces para entrar en determinados tipos de células (p. ej., los descritos en la presente memoria), su eficacia puede verse reducida por la presencia de proteasas. Las proteasas séricas tienen requerimientos específicos de sustratos. El sustrato debe tener tanto L-aminoácidos como enlaces peptídicos para la escisión. Además, las exopeptidasas, que representan el componente más destacado de la actividad proteasa en el suero, generalmente actúan sobre el primer enlace peptídico del polipéptido y requieren un extremo N libre (Powell *et al.*, *Pharm. Res.* 10:1268-1273, 1993). A la luz de esto, a menudo es ventajoso usar versiones modificadas de polipéptidos. Los polipéptidos modificados conservan las características estructurales de los polipéptidos de L-aminoácidos originales que confieren actividad biológica con respecto a IGF-1, pero, ventajosamente, no son fácilmente susceptibles a la escisión por proteasas y/o exopeptidasas.

Se puede usar la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con D-aminoácido del mismo tipo (p. ej., D-lisina en lugar de L-lisina) para generar polipéptidos más estables. Por lo tanto, un derivado polipeptídico o peptidomimético puede ser polipéptido todo L, todo D, o D y L mixto. La presencia de un D-aminoácido N-terminal o C-terminal aumenta la estabilidad *in vivo* de un polipéptido, porque las peptidasas no pueden utilizar un D-aminoácido como sustrato (Powell *et al.*, *Pharm. Res.* 10:1268-1273, 1993). Los polipéptidos D inversos son polipéptidos que contienen D-aminoácidos, dispuestos en una secuencia inversa en relación con un polipéptido que contiene L-aminoácidos. Por lo tanto, el resto C-terminal de un polipéptido de L-aminoácidos se convierte en N-terminal para el polipéptido de D-aminoácidos, y así sucesivamente. Los polipéptidos D inversos conservan la misma configuración terciaria y, por lo tanto, la misma actividad, que los polipéptidos de L-aminoácidos, pero son más estables a la degradación enzimática *in vitro* e *in vivo*, y por lo tanto, tienen mayor eficacia terapéutica que el polipéptido (Brady y Dodson, *Nature* 368:692-693, 1994; Jameson *et al.*, *Nature* 368:744-746, 1994). Además de los polipéptidos de D inversos, los polipéptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso esencialmente idéntica pueden generarse mediante métodos bien conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387-418, 1992). Por ejemplo, los polipéptidos restringidos se pueden generar añadiendo restos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro y, por lo tanto, dando lugar a un polipéptido cíclico. Los polipéptidos cíclicos no tienen extremos N o C libres. Por consiguiente, no son susceptibles a la proteólisis por exopeptidasas, aunque son, por supuesto, susceptibles a las endopeptidasas, que no se escinden en los extremos peptídicos. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos con D-aminoácidos N-terminales o C-terminales y de los polipéptidos cíclicos normalmente son idénticas a las secuencias de los polipéptidos a las que corresponden, excepto por la presencia del resto de D-aminoácido N-terminal o C-terminal, o su estructura circular, respectivamente.

Un derivado cíclico que contiene un enlace disulfuro intramolecular se puede preparar mediante la síntesis en fase sólida convencional mientras se incorporan restos adecuados de cisteína u homocisteína protegidos con S en las posiciones seleccionadas para la ciclación, tales como los extremos amino y carboxi (Sah *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol* 48:197, 1996). Tras completar el ensamblaje de la cadena, la ciclación se puede realizar bien (1) mediante la eliminación selectiva del grupo protector S con la consiguiente oxidación en el soporte de las dos funciones SH libres correspondientes, para formar un enlace S-S, seguida de la eliminación convencional del producto del soporte y el procedimiento de purificación apropiado; o (2) mediante la eliminación del polipéptido del soporte junto con la desprotección completa de la cadena lateral, seguida de la oxidación de las funciones SH libres en una solución acuosa muy diluida.

El derivado cíclico que contiene un enlace de amida intramolecular puede prepararse mediante la síntesis en fase sólida convencional al tiempo que incorpora derivados de aminoácido protegidos de cadena lateral de amino y carboxilo adecuados, en la posición seleccionada para la ciclación. Los derivados cíclicos que contienen enlaces -S-alquilo intramoleculares se pueden preparar mediante química convencional en fase sólida al tiempo que incorporan un resto de aminoácido con una cadena lateral protegida con amino adecuada y un resto adecuado de cisteína u homocisteína protegido con S en la posición seleccionada para la ciclación.

Otro enfoque eficaz para conferir resistencia a las peptidasas que actúan sobre los restos N-terminales o C-terminales de un polipéptido es añadir grupos químicos en los extremos del polipéptido, de modo que el polipéptido modificado ya no sea un sustrato para la peptidasa. Una de dichas modificaciones químicas es la glicosilación de los polipéptidos en uno o ambos extremos. Se ha demostrado que ciertas modificaciones químicas, en particular la glicosilación N-terminal, aumentan la estabilidad de los polipéptidos en suero humano (Powell *et al.*, *Pharm. Res.* 10:1268-1273, 1993). Otras modificaciones químicas que potencian la estabilidad del suero incluyen, pero sin limitación, la adición de un grupo alquilo N-terminal, que consiste en un alquilo inferior de uno a veinte átomos de carbono, tales como un grupo acetilo y/o la adición de un grupo amida C-terminal o grupo amida sustituido. En particular, las composiciones y los métodos de la presente descripción pueden incluir polipéptidos modificados que consistan en polipéptidos portadores de un grupo acetilo N-terminal y/o un grupo amida C-terminal.

La presente descripción también incluye otros tipos de derivados polipeptídicos que contienen fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte del polipéptido, siempre que el derivado conserve la actividad funcional deseada del polipéptido. Los ejemplos de dichos derivados incluyen (1) derivados de N-acilo del extremo amino o de otro grupo amino libre, en donde el grupo acilo puede ser un grupo alcanóilo (p. ej., acetilo, hexanoílo, octanoílo) y un grupo aroílo (p. ej., benzoílo) o un grupo bloqueador tal como F-moc (fluorenilmetil-O-CO-); (2) ésteres del extremo carboxi o de otro grupo carboxi o hidroxilo libre; (3) amida del extremo carboxi o de otro grupo carboxilo libre producido mediante la reacción con amoníaco o con una amina adecuada; (4) derivados fosforilados; (5) derivados conjugados con un anticuerpo u otro ligando biológico y otros tipos de derivados.

También se describen secuencias polipeptídicas más largas que proceden de la adición de restos de aminoácidos adicionales a los polipéptidos. Se esperaría que dichas secuencias polipeptídicas más largas tuvieran la misma actividad biológica (p. ej., que entraran en determinados tipos de células) que los polipéptidos descritos anteriormente. Si bien no se excluyen los polipéptidos que tienen un número sustancial de aminoácidos adicionales, se reconoce que algunos polipéptidos grandes pueden adoptar una configuración que enmascare la secuencia eficaz, evitando así la unión a una diana (p. ej., un miembro de la familia de receptores de LRP tal como el LRP o LRP2). Estos derivados podrían actuar como antagonistas competitivos. Por lo tanto, aunque la presente descripción abarca polipéptidos o derivados de los polipéptidos descritos en la presente memoria que tienen una extensión, deseablemente, la extensión no destruye la actividad de dirección celular del polipéptido o derivado.

Otros derivados que se pueden usar son polipéptidos duales que consisten en dos de los mismos, o dos polipéptidos diferentes descritos en la presente memoria unidos covalentemente entre, sí ya sea directamente o a través de un espaciador, tal como por un tramo corto de restos de alanina o por un supuesto sitio para la proteólisis (p. ej., mediante catepsina, véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 5.126.249 y la patente europea n.º 495.049). Los multímeros de los polipéptidos consisten en un polímero de moléculas formadas a partir de los mismos o diferentes polipéptidos, o derivados de los mismos.

La presente descripción también abarca derivados de polipéptidos que son proteínas quiméricas o de fusión que contienen un polipéptido descrito en la presente memoria, o un fragmento del mismo, unidos en su extremo amino o carboxi terminal, o ambos, a una secuencia de aminoácidos de una proteína diferente. Dicha proteína quimérica o de fusión se puede producir mediante la expresión recombinante de un ácido nucleico codificante de la proteína. Por ejemplo, una proteína quimérica o de fusión puede contener al menos 6 aminoácidos de un polipéptido usado en la presente descripción, y deseablemente tiene una actividad funcional equivalente o superior a la de un polipéptido usado en la descripción.

Los derivados de polipéptidos pueden prepararse modificando las secuencias de aminoácidos mediante sustitución, adición o eliminación de un resto de aminoácido para proporcionar una molécula funcionalmente equivalente, o una molécula funcionalmente aumentada o disminuida, según se desee. Los derivados incluyen, pero sin limitación, aquellos que contienen, como secuencia primaria de aminoácidos, la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos descritos en la presente memoria (p. ej., una cualquiera de SEQ ID NO: 1-105 y 107-116),

incluyendo las secuencias modificadas que contienen sustituciones de restos de aminoácidos funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia por otro aminoácido de polaridad similar que actúe como un equivalente funcional, dando lugar a una modificación silenciosa. La sustitución de un aminoácido dentro de la secuencia puede seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen leucina, isoleucina, alanina, fenilalanina, valina, prolina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares no cargados incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido glutámico y ácido aspártico. El aminoácido glicina puede incluirse bien en la familia de aminoácidos no polares o en la familia de aminoácidos polares no cargados (neutros). Las sustituciones realizadas dentro de una familia de aminoácidos se entienden, en general, como sustituciones conservativas.

Ensayos para identificar peptidomiméticos

Como se ha descrito anteriormente, los compuestos no peptídicos generados para replicar la geometría de la estructura principal y la visualización del farmacóforo (peptidomiméticos) de los polipéptidos identificados mediante los métodos pueden poseer atributos de mayor estabilidad metabólica, mayor potencia, mayor duración de la acción y mejor biodisponibilidad.

Los compuestos peptidomiméticos pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de colecciones combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: colecciones biológicas; colecciones de fase sólida o de fase de solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de colecciones sintéticas que requieren la desconvolución; el método la colección de "una perla, un compuesto"; y métodos de colecciones sintéticas que usan la selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de colecciones biológicas se limita a las colecciones de polipéptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a las colecciones de compuestos de polipéptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam, *Anticancer Drug Des.* 12:145, 1997). Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de colecciones moleculares en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 90:6909, 1993); Erb *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 91:11422, 1994); Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:2678, 1994); Cho *et al.* (*Science* 261:1303, 1993); Carell *et al.* (*Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* 33:2059, 1994 e *ibid* 2061); y en Gallop *et al.* (*Med. Chem.* 37:1233, 1994). Las colecciones de compuestos pueden presentarse en solución (p. ej., Houghten, *Biotechniques* 13:412-421, 1992) o en perlas (Lam, *Nature* 354:82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364:555-556, 1993), bacterias o esporas (patente de EE.UU. N.º 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 89:1865-1869, 1992) o en fagos (Scott y Smith, *Science* 249: 386-390, 1990) o luciferasa, y el marcador enzimático detectado mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

Una vez que se identifica un polipéptido que se puede usar, se puede aislar y purificar mediante cualquier número de métodos convencionales que incluyen, pero sin limitación, solubilidad diferencial (p. ej., precipitación), centrifugación, cromatografía (p. ej., afinidad, intercambio iónico, exclusión de tamaño y similares) o mediante cualquier otra técnica convencional usada para la purificación de polipéptidos, peptidomiméticos o proteínas. Las propiedades funcionales de un polipéptido de interés identificado pueden evaluarse usando cualquier ensayo funcional conocido en la técnica. De manera deseable, se usan ensayos para evaluar la función del receptor cadena abajo en la señalización intracelular (p. ej., la proliferación celular).

Por ejemplo, los compuestos peptidomiméticos pueden obtenerse usando el siguiente proceso de tres fases: (1) escanear los polipéptidos usados en la presente descripción para identificar regiones de estructura secundaria necesarias para dirigirse a los tipos de células particulares descritos en la presente memoria; (2) usar sustitutos de dipéptidos de configuración restringida para perfeccionar la geometría de la cadena principal y proporcionar plataformas orgánicas correspondientes a estos sustitutos; y (3) usar las mejores plataformas orgánicas para mostrar los farmacóforos orgánicos en colecciones de candidatos diseñadas para imitar la actividad deseada del polipéptido nativo. En más detalle, las tres fases son las siguientes. En la fase 1, se escanean los polipéptidos candidatos principales y se resume su estructura para identificar los requisitos para su actividad. Se sintetiza una serie de análogos de polipéptidos del original. En la fase 2, los mejores análogos de polipéptidos se investigan usando sustitutos de dipéptidos de configuración restringida. Los aminoácidos indolizidin-2-ona, indolizidin-9-ona y quinolizidinona (I²aa, I⁹aa y Qaa respectivamente) se usan como plataformas para estudiar la geometría de la estructura principal de los mejores polipéptidos candidatos. Estas y plataformas relacionadas (revisadas en Halab *et al.*, *Biopolymers* 55:101-122, 2000; y Hanessian *et al.* *Tetrahedron* 53:12789-12854, 1997) pueden introducirse en regiones específicas del polipéptido para orientar los farmacóforos en diferentes direcciones. La evaluación biológica de estos análogos identifica polipéptidos principales mejorados que imitan los requisitos geométricos para la actividad. En la fase 3, las plataformas de los polipéptidos principales más activos se usan para mostrar sustitutos de los farmacóforos responsables de la actividad del polipéptido nativo. Los farmacóforos y los armazones se combinan en un formato de síntesis paralelo. La derivación de polipéptidos y las fases anteriores se pueden realizar mediante otros medios usando métodos conocidos en la técnica.

Las relaciones entre la función y la estructura determinadas a partir de los polipéptidos, derivados de polipéptidos, peptidomiméticos u otras moléculas pequeñas que se usan en la presente descripción pueden usarse para perfeccionar y preparar estructuras moleculares análogas que tienen propiedades similares o mejores. Por consiguiente, los compuestos usados en la presente descripción también incluyen moléculas que comparten la

estructura, la polaridad, las características de carga y las propiedades de cadena lateral de los polipéptidos descritos en la presente memoria.

En resumen, basándose en la descripción de la presente memoria, los expertos en la técnica pueden desarrollar ensayos de selección de polipéptidos y peptidomiméticos que sean útiles para identificar compuestos para dirigir un agente a determinados tipos de células (p. ej., los descritos en la presente memoria). Los ensayos pueden desarrollarse para formatos de selección de bajo rendimiento, alto rendimiento o rendimiento ultralto. Los ensayos incluyen ensayos que son susceptibles de automatización.

Conjugados

Los polipéptidos descritos en la presente memoria o derivados de los mismos pueden unirse a un agente. Por ejemplo, el polipéptido (p. ej., cualquiera descrito en la presente memoria) puede unirse a un agente terapéutico, a un agente de diagnóstico o a un marcador. En determinadas realizaciones, el polipéptido está enlazado a o marcado con un marcador detectable, tal como un agente de radioimagen, para el diagnóstico de una enfermedad o afección. Los ejemplos de estos agentes incluyen un conjugado de agente de radioimagen-anticuerpo-vector, en donde el anticuerpo se une a un antígeno específico de una enfermedad o afección (p. ej., para diagnóstico o terapia). Otras moléculas de unión también están contempladas por la descripción. En otros casos, el polipéptido o derivado está enlazado a un agente terapéutico, para tratar una enfermedad o afección, o puede estar enlazado o marcado con mezclas de los mismos. La enfermedad o afección puede tratarse mediante la administración de un conjugado de vector-agente a un individuo en condiciones que permitan el transporte del agente a través de la BHE o a un tipo de célula particular. Cada polipéptido puede incluir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 agentes. En otras realizaciones, cada agente tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 o más polipéptidos unidos al mismo. Los conjugados pueden ser capaces de potenciar la acumulación (p. ej., debido a una mayor captación o reducción de la eliminación) del agente en un determinado tipo de célula o de tejido tal como hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo de un sujeto.

El agente se puede liberar del vector después del transporte a un tipo de célula particular o a través de la BHE. El agente puede liberarse, por ejemplo, mediante escisión enzimática u otra rotura de un enlace químico entre el vector y el agente. El agente liberado puede entonces funcionar en su capacidad prevista en ausencia del vector.

Agentes terapéuticos. Un agente terapéutico puede ser cualquier agente biológicamente activo. Por ejemplo, un agente terapéutico puede ser un fármaco, un medicamento, un agente que emite radiación, una toxina celular (por ejemplo, un agente quimioterapéutico), un fragmento biológicamente activo de la misma o una mezcla de los mismos para tratar una enfermedad (p. ej., para eliminar células cancerosas) o puede ser un agente para tratar una enfermedad o afección en un individuo. Un agente terapéutico puede ser un producto sintético o un producto de origen fúngico, bacteriano o de otro microorganismo (p. ej., micoplasma o virus), animal, tal como reptil, o vegetal. Un agente terapéutico y/o un fragmento biológicamente activo del mismo puede ser un agente enzimáticamente activo y/o un fragmento del mismo, o puede actuar inhibiendo o bloqueando una vía celular importante y/o esencial o compitiendo con un componente celular importante y/o esencial de origen natural. Otros agentes terapéuticos incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

Agentes contra el cáncer. Cualquier agente contra el cáncer conocido en la técnica puede ser parte de un conjugado. En determinadas realizaciones, el agente es paclitaxel o un análogo de paclitaxel (p. ej., los descritos en la presente memoria). Los cánceres del cerebro se pueden tratar con un conjugado que contenga un vector que se transporte de manera eficaz a través de la BHE (p. ej., AngioPep-1, AngioPep-2, AngioPep-3, AngioPep-4a, AngioPep-4b, AngioPep-5 o AngioPep-6). Los cánceres de hígado, pulmón, riñón o bazo pueden tratarse con un agente contra el cáncer conjugado a un vector que se transporta de manera eficaz al tipo de célula apropiado (p. ej., AngioPep-7). Los agentes ilustrativos incluyen abarelix, aldesleukina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, alitretamina, amifostina, anakinra, anastrozol, trióxido arsénico, asparaginasa, azacitidina, BCG Live, bevacuzimab, bexaroteno, bleomicina, bleomicina, bortezombi, bortezomib, busulfán, busulfán, calusterona, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, clorambucil, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, actinomocina D, dalteparina (p. ej., sodio), darbepoetina alfa, dasatinib, daunorrubicina, daunomicina, decitabina, denileukina, Denileukina diftitox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, propionato de dromostanolona, eculizumab, epirubicina (e.g., HCl), epoetina alfa, erlotinib, estramustina, etopósido (p. ej., fosfato), exemestane, fentanil (p. ej., citrato), filgrastim, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina (e.g., HCl), gemtuzumab, ozogamicina, goserelina (p. ej., acetato), histrelina (p. ej., acetato), hidroxiurea, ibritumomab tiuxetano, idarubicina, ifosfamida, imatinib (p. ej., mesilato), interferón alfa-2b, irinotecán, ditosilato de lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida (p. ej., acetato), levamisol, lomustina, CCNU, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), megestrol, melfalán (L-PAM), mercaptopurina (6-MP), mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, fenpropionato de nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvekina, oxaliplatino, paclitaxel, palifermina, pamidronato, panitumumab, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, peginterferón alfa-2b, pemetrexed (p. ej., disódico), pentostatina, pipobromano, plicamicina (mitramicina), porfímero (p. ej., sodio), procarbazona, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostim, sorafenib, estreptozocina, sunitinib (p. ej., maleato), talco, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido (VM-26), testolactona, talidomida, tioguanina (6-TG), tiotepa, tiotepa, tiotepa, topotecán (p. ej., HCl), toremifeno, Tositumomab/I-131 (tositumomab), trastuzumab, trastuzumab, tretinoína (ATRA), mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vorinostat, zoledronato y ácido zoledrónico.

Marcadores detectables. Para fines de detección o diagnóstico, el conjugado puede estar marcado. Los marcadores detectables pueden ser un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador activo de resonancia magnética nuclear, un marcador luminiscente, un marcador cromóforo, un isótopo que emite positrones para el escáner PET, un marcador de quimioluminiscencia o un marcador enzimático. Los ejemplos de agentes de radioimagen que emiten radiación (radiomarcadores detectables) incluyen indio-111, tecnitio-99 o dosis bajas de yodo-131. Los radionúclidos emisores gamma y beta incluyen ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{90}Y , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{201}Tl . Los radionúclidos emisores de positrones incluyen ^{18}F , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb y ^{86}Y . Los marcadores fluorescentes incluyen Cy5.5, Alexa 488, proteína verde fluorescente (GFP), fluoresceína y rodamina. Los marcadores de quimioluminiscencia incluyen luciferasa y β -galactosidasa. Los marcadores enzimáticos incluyen peroxidasa y fosfatasa. Un marcador de His también puede ser un marcador detectable. Por ejemplo, los conjugados pueden incluir una fracción de vector y una fracción de anticuerpo (anticuerpo o fragmento de anticuerpo), que puede incluir además un marcador. En este caso, el marcador se puede unir al vector o al anticuerpo.

Anticuerpos. Los anticuerpos también pueden ser parte de un conjugado. La conjugación se realiza usando cualquier medio conocido en la técnica (p. ej., usando las estrategias de conjugación descritas en la presente memoria). Cualquier anticuerpo de diagnóstico o terapéutico puede conjugarse con uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) vectores. Además, los fragmentos de anticuerpos (p. ej., capaces de unirse a un antígeno) también pueden conjugarse con los vectores. Los fragmentos de anticuerpos incluyen las regiones Fab y Fc, la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo (p. ej., de cualquier anticuerpo descrito en la presente memoria). Los anticuerpos ilustrativos para su uso en el diagnóstico y la terapia del cáncer incluyen ABX-EGF (Panitumumab), OvaRex (Oregovemab), Theragyn (pemtumomabirrio-90), Therex, Bivatuzumab, Panorex (Edrecolomab), ReoPro (Abciximab), Bexxar (Tositumomab), Anticuerpo monoclonal, 105AD7 idiopático, Anti-EpCAM (Catumaxomab), Anticuerpo monoclonal de cáncer de pulmón (de Cytoclonal), Herceptina (Trastuzumab), Rituxán (Rituximab), Avastina (Bevacizumab), Fab de AMD (Ranibizumab), E-26 (IgE de 2ª gen.) (Omalizumab), Zevalin (Rituxán + itrio-90) (Ibritumomab tiuxetán), Cetuximab, BEC2 (Mitumomab), IMC-1C11, nuC242-DMI, LymphoCide (Epratuzumab), LymphoCide Y-90, CEA-Cide (Labetuzumab), CEA-Cide Y-90, CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m), LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m), LymphoScan (bectumomab marcado con Tc-99m), AFP-Scan (marcado con Tc-99m), HumaRAD-HN (+ itrio-90), HumaSPECT (Votumumab), MDX-101 (CTLA-4), MDX-210 (sobrexpresión de her-2), MDX-210/MAK, Vitaxina, Anticuerpo monoclonal 425, IS-IL-2, Campath (alemtuzumab), estreptavidina CD20, Avidicina, (Albúmina + NRLU13), Oncolym (+ yodo-131) Cotara (+ yodo-131), C215 (+ enterotoxina estafilocócica, Anticuerpo monoclonal de cáncer de pulmón/riñón (de Pharmacia Corp.), nacolomab tafenatox (enterotoxina estafilocócica C242), Nuvion (Visilizumab), SMART MI95, SMART 1D10, CEAVac, TriGem, TriAb, NovoMAB-G2 radiomarcado, Monopharm C, GlioMAB-H (+ toxina gelonina), Rituxán (Rituximab) y ING-1. Otros anticuerpos terapéuticos incluyen 5G1.1 (Ecluzumab), 5G1.1-SC (Pexelizumab), ABX-CBL (Gavilimomab), ABX-IL8, Antegen (Natalizumab), Anti-CD11a (Efalizumab), Anti-CD 18 (de Genetech), Anti-LFAI, Antova, BTI-322, CDP571, CDP850, Corsevina M, D2E7 (Adalimumab), Humira (Adalimumab), Hu23F2G (Rovelizumab), IC14, IDEC-114, IDEC-131, IDEC-151, IDEC-152, Infliximab (Remicade), LDP-01, LDP-02, MAK-195F (Afelimomab), MDX-33, MDX-CD4, MEDI-507 (Siplizumab), OKT4A, OKT3 (Muromonab-CD3) y ReoPro (Abciximab).

Enlazadores de conjugación

El conjugado (p. ej., un conjugado de polipéptido-agente) puede obtenerse usando cualquier reactivo o protocolo de entrecruzamiento (conjugación) conocido en la técnica, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Dichos protocolos y reactivos incluyen, agentes de entrecruzamiento reactivos con grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, carbonilo, carbohidrato y/o fenol. Las cantidades, los tiempos y las condiciones de dichos protocolos pueden variar para optimizar la conjugación. Los reactivos de entrecruzamiento contienen al menos dos grupos reactivos y se dividen, en general, en agentes de entrecruzamiento homofuncionales (que contienen grupos reactivos idénticos) y agentes de entrecruzamiento heterofuncionales (que contienen grupos reactivos no idénticos). Los agentes de entrecruzamiento pueden ser homobifuncionales y/o heterobifuncionales. Además, el agente de entrecruzamiento puede incorporar un "espaciador" entre las fracciones reactivas, o las dos fracciones reactivas del agente de entrecruzamiento pueden estar enlazadas directamente. Los enlaces pueden incluir enlaces de éster.

Los enlazadores ilustrativos incluyen BS³ [bis(sulfosuccinimidil)suberato], NHS/EDC (*N*-hidroxisuccinimida y *N*-etil-(dimetilaminopropil)carbodimida, Sulfo-EMCS ([*N*-e-ácido maleimidocaproico]hidrazida), SATA (*N*-succinimidil-S-acetiltioacetato) e hidrazida. BS³ es un éster de *N*-hidroxisuccinimida homobifuncional que se dirige a las aminas primarias accesibles. En la Fig. 2, se ilustra un esquema de conjugación. NHS/EDC permite la conjugación de grupos amina primarios con grupos carboxilo. Sulfo-EMCS son grupos reactivos heterobifuncionales (maleimida y NHS-éster) que son reactivos hacia grupos sulfhidrilo y amino. El acoplamiento de aminas usando la activación de sulfo-NHS/EDC se puede usar para entrecruzar los anticuerpos terapéuticos con los polipéptidos, como se ilustra en las Fig. 3 y 4. Esta es una técnica de acoplamiento rápida, simple y reproducible. El conjugado resultante es estable y conserva la actividad biológica del anticuerpo. Además, tiene una alta capacidad de conjugación que se puede controlar de manera confiable y una baja interacción inespecífica durante los procedimientos de acoplamiento. SATA es reactivo hacia las aminas y añade grupos sulfhidrilos protegidos. El NHS-éster reacciona con las aminas primarias para formar enlaces de amida estables. Los grupos sulfhidrilo pueden desprotegerse usando hidroxilamina. Este método de conjugación se ilustra en la Fig. 5. La hidrazida se puede usar para enlazar grupos carboxilo a aminas primarias, como se muestra en la Fig. 6 y, por lo tanto, puede ser útil para enlazar glicoproteínas. En la Fig. 7, se ilustran enlazadores ilustrativos adicionales.

Las moléculas pequeñas, tales como los agentes terapéuticos, pueden conjugarse con polipéptidos (p. ej., los descritos en la presente memoria). La molécula pequeña ilustrativa, paclitaxel, tiene dos posiciones estratégicas (posición C2' y C7) útiles para la conjugación. La conjugación de un vector con paclitaxel se puede realizar de la siguiente manera (Fig. 8). En resumen, se hace reaccionar paclitaxel con piridina succínica de anhídrido durante tres horas a temperatura ambiente para unir un grupo succinilo en la posición 2'. El 2'-succinil-paclitaxel tiene un enlace éster escindible en la posición 2' que simplemente puede liberar ácido succínico. Este enlace de éster escindible se puede usar además para diversas modificaciones con enlazadores, si se desea. El 2'-O-succinil-paclitaxel resultante se hace reaccionar después con EDC/NHS en DMSO durante nueve horas a temperatura ambiente, seguido de la adición del vector en Ringer/DMSO durante un tiempo de reacción adicional de cuatro horas a temperatura ambiente. La reacción de conjugación representada en la Fig. 8 se controla mediante HPLC. Cada producto intermedio, tal como paclitaxel, 2'-O-succinil-paclitaxel y 2'-O-NHS-succinil-paclitaxel, se purifica y se valida usando diferentes enfoques tales como HPLC, cromatografía de líquidos de capa fina, RMN (intercambio de ¹³C o ¹H), punto de fusión, espectrometría de masas. El conjugado final se analiza mediante espectrometría de masas y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Esto permite determinar el número de moléculas de paclitaxel conjugadas en cada vector.

Composiciones farmacéuticas

Debido a que los agentes hidrófobos suelen presentar solubilidad limitada en solución acuosa, las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agentes solubilizantes, en donde dicho agente solubilizante es un éster de polioxietileno de un ácido graso. Las formulaciones ilustrativas de la presente invención de ANG1005 incluyen DMSO y Solutol HS 15; sin embargo, otros agentes solubilizantes, bien en lugar o además de estos agentes, pueden ser útiles en las composiciones de la invención. Las composiciones pueden incluir además agentes de tamponamiento, opcionalmente, agentes de tonicidad y agentes de carga.

Agentes solubilizantes

Las composiciones y los métodos pueden incluir cualquier agente solubilizante conocido en la técnica. Dichos agentes pueden constituir al menos el 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % de masa de la composición. Los solubilizantes ilustrativos incluyen disolventes orgánicos hidrosolubles (p. ej., polietilenglicol 300, polietilenglicol 400, etanol, propilenglicol, glicerina, *N*-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida y dimetilsulfóxido), tensioactivos no iónicos (p. ej., Cremophor EL, Cremophor RH 40, Cremophor RH 60, succinato de polietilenglicol 1000 de α -tocoferol, polisorbato 20, polisorbato 80, Solutol HS 15 (Hidroxiestearato de Macrogol 15), monooleato de sorbitán, poloxámero 407, Labrafil M-1944CS, Labrafil M-2125CS, Labrasol, Gellucire 44/14, Softigen 767 y ésteres de ácidos mono- y di-grasos de PEG 300, 400 o 1750), lípidos insolubles en agua (p. ej., aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de menta, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceites vegetales hidrogenados, aceite de soja hidrogenado y triglicéridos de cadena media de aceite de coco y aceite de semilla de palma), líquidos orgánicos/semisólidos (cera de abeja, α -tocoferol, oleico ácido, mono y diglicéridos de cadena media), ciclodextrinas (p. ej., α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina y sulfobutiléter- β -ciclodextrina), y fosfolípidos (p. ej., fosfatidilcolina de soja hidrogenada, diestearoilfosfatidilglicerol, 1- α -dimiristoilfosfatidilcolina, 1- α -dimiristoilfosfatidilglicerol). En las composiciones liofilizadas de la presente invención, el agente solubilizante es un polioxietilénéster de un ácido graso.

Agente de tamponamiento

Las composiciones de la invención también incluyen uno o más agentes de tamponamiento. Dependiendo del agente hidrófobo, puede ser deseable mantener el pH o la tonicidad de la composición farmacéutica (p. ej., para minimizar la degradación del agente activo o para maximizar la seguridad o la eficacia del agente cuando se usa en el tratamiento). El tampón a cualquier pH o intervalo de pH en particular se puede lograr usando el tampón apropiado (p. ej., a pH 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, o cualquier intervalo entre estos valores). El tampón puede presentar cualquier concentración necesaria para lograr el efecto de tamponamiento deseado (p. ej., 1 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1,0 M, 1,5 M, o cualquier intervalo entre estos valores). Los agentes de tamponamiento ilustrativos incluyen ácido cítrico/fosfato, acetato, barbital, borato, Britton-Robinson, cacodilato, citrato, colidina, formiato, maleato, Mcllvaine, fosfato, Prideaux-Ward, succinato, citrato-fosfato-borato (Teorell-Stanhagen), acetato de veronal, MES (ácido 2-(*N*-morfolin)etanosulfónico), BIS-TRIS (bis(2-hidroxietil)iminotris-(hidroximetil)metano), ADA (ácido *N*-(2-acetamido)-2-iminodiacético), ACES (ácido *N*-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfonaico), PIPES (ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etanosulfónico)), MOPSO (ácido 3-(*N*-morfolin)-2-hidroxiopropanosulfónico), BIS-TRIS PROPANO (1,3-bis(tris (hidroximetil)metilamino)propano), BES (ácido *N,N*-bis(2-hidroxietil)-2-amino-etanosulfonaico), MOPS (ácido 3-(*N*-morfolin)propanosulfónico), TES (ácido *N*-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico), HEPES (ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazin-*N'*-(2-etanosulfónico)), DIPSO (ácido 3-(*N,N*-bis(2-hidroxietil)amino)-2-hidroxiopropano-sulfónico), MOBS (ácido 4-(*N*-morfolin)butanosulfónico), TAPSO (ácido 3-(*N*-tris(hidroximetil)metil-amino)-2-hidroxiopropanosulfónico), TRIZMA (tris(hidroximetil-aminometano), HEPPSO (ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazin-*N'*-(2-hidroxipropanosulfónico)), POPSO (ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-hidroxiopropano-sulfónico)), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido *N*-(2-hidroxietil)-piperazin-*N'*-(3-propanosulfónico)), TRICINA (*N*-tris(hidroximetil)metilglicina), GLY-GLY (glicilglicina), BICINE (*N,N*-bis(2-hidroxietil)glicina), HEPBS (ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazin-*N'*-(4-butanosulfónico)), TAPS (ácido *N*-

tris(hidroxiometil)metil-3-amino-propanosulfónico), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol) y/o cualquier otro tampón conocido en la técnica.

La tonicidad se puede, además o en lugar de un agente de tamponamiento, mantener usando cualquier sal farmacéuticamente aceptable conocida en la técnica. Las sales ilustrativas incluyen acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio. Dichas sales, bien junto o en combinación con los agentes de tamponamiento, pueden estar presentes en una cantidad suficiente para mantener la tonicidad deseada (p. ej., 1 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1,0 M, 1,5 M, o cualquier intervalo entre estos valores).

Otros excipientes

Las composiciones y los métodos de la invención incluyen un agente de carga. Los agentes de carga son particularmente deseables cuando la composición farmacéutica se proporciona en una forma deshidratada (p. ej., liofilizada). Las composiciones liofilizadas pueden contener menos del 10 % (p. ej., menos del 8 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %) de agua u otro disolvente en peso. Debido a que las composiciones deshidratadas administradas por las vías parenterales se disuelven normalmente en una solución acuosa antes de la administración a un paciente, puede ser importante que el proceso de deshidratación proceda de una manera que permita la resolubilización. Se pueden añadir agentes de carga para garantizar que el producto liofilizado pueda volverse a disolver más fácilmente. Dichos agentes son conocidos en la técnica e incluyen polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, dextrano; azúcares tales como dextrosa, manitol, sacarosa, lactosa, trehalosa y sorbitol; aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido aspártico; y proteínas solubles tales como colágeno, gelatina o albúmina sérica.

Las composiciones pueden comprender además conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabenos), la unión covalente de polímeros tales como el polietilenglicol a la proteína, la complejación con iones metálicos o la incorporación del material a o sobre preparados de partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas eritrocíticos o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos lipófilos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). También se engloban composiciones en partículas recubiertas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones incorporan recubrimientos protectores en forma de partículas, inhibidores de proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo las vías parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal, rectal. En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, paracancerígena, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

Formas sólidas de dosificación para uso oral

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el/los principio/s activo/s en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, y el experto en la técnica conoce dichas formulaciones (p. ej., U.S.P.N.: 5.817.307, 5.824.300, 5.830.456, 5.846.526, 5.882.640, 5.910.304, 6.036.949, 6.036.949, 6.372.218). Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (p. ej., sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, lactosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y disgregación (p. ej., derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido algínico); agentes aglutinantes (p. ej., sacarosa, glucosa, sorbitol, goma arábiga, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de magnesio y aluminio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (p. ej., estearato de magnesio, estearato de cinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes de tamponamiento y similares.

Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. El recubrimiento puede adaptarse para liberar el agente en un patrón predeterminado (p. ej., para lograr una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar el/los agente/s hasta después de haber pasado por el estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (p. ej., basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona) o un recubrimiento entérico (p. ej., basado en copolímero de ácido metacrílico, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de polivinilacetato, goma laca y/o etilcelulosa). Además, se puede emplear un material de retardo temporal tal como, p.ej., monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados, (p. ej., degradación química antes de la liberación de las sustancias activas). El

recubrimiento se puede aplicar sobre la forma farmacéutica sólida de una manera similar a la descrita en *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, mencionado anteriormente.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como comprimidos masticables o como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (p. ej., almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda, en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados se pueden preparar usando los ingredientes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de una manera convencional usando, p.ej., un mezclador, un aparato de lecho fluido o un equipo de secado por pulverización.

10 Métodos de tratamiento

Se describen métodos de tratamiento usando los agentes descritos en la presente memoria. Los agentes contra el cáncer y los conjugados descritos en la presente memoria (p. ej., ANG1005) se pueden usar para tratar cualquier cáncer conocido en la técnica. Los conjugados que incluyen los péptidos descritos en la presente memoria pueden ser capaces de atravesar la BHE (p. ej., AngioPep-1 a través de AngioPep-6) y, por lo tanto, pueden usarse para tratar cualquier enfermedad cerebral o del sistema nervioso central (p. ej., un cáncer cerebral tal como glioblastoma), astrocitoma, glioma, meduloblastoma y oligodendroma, neuroglioma, ependimoma y meningioma). Estos conjugados también pueden ser transportados eficazmente al hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo (p. ej., AngioPep-1 a través de AngioPep-7) y, por lo tanto, también puede usarse, junto con un agente terapéutico apropiado, para tratar una enfermedad asociada con estos tejidos (p. ej., un cáncer tal como el carcinoma hepatocelular, cáncer de hígado, carcinoma de células pequeñas (p. ej., cáncer de células en avena), carcinoma mixto de células pequeñas y grandes, carcinoma combinado de células pequeñas y tumores metastásicos. Los tumores metastásicos pueden originarse a partir de cáncer de cualquier tejido, incluyendo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de vejiga, neuroblastoma, tumor de Wilm, linfoma, linfoma no Hodgkin y ciertos linfomas de linfocitos T). Otros cánceres ilustrativos que pueden tratarse usando una composición de la invención incluyen carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello, incluyendo varios linfomas tales como linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin, adenoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de laringe, cánceres de la retina, cánceres del esófago, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de útero, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (incluyendo el carcinoma pulmonar de células no pequeñas), cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de piel, carcinoma nasofaríngeo, liposarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de vesícula biliar, adenocarcinoma de parótida, sarcoma endometrial, cánceres resistentes a múltiples fármacos; y enfermedades y afecciones proliferativas, tales como la neovascularización asociada con angiogénesis tumoral, degeneración macular (p. ej., DMA húmeda/seca), neovascularización corneal, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración miópica, y otras enfermedades proliferativas y afecciones tales como la restenosis y la enfermedad de riñón poliquístico. Los cánceres cerebrales que pueden tratarse con vectores que se transportan de manera eficaz a través de la BHE incluyen el astrocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor neuroepitelial disembrionoplásico, oligodendrogliomas, ependimoma, glioblastoma multiforme, gliomas mixtos, oligoastrocitomas, meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, germinoma y teratoma.

Una composición de la invención se puede administrar por cualquier medio conocido en la técnica; p.ej., la vía oral, intraarterial, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica o *per os* para el sujeto. El agente puede ser, por ejemplo, un compuesto antiangiogénico.

Dosis

La dosis de cualquier conjugado o composición descrito o identificado en la presente memoria usando los métodos descritos en la presente memoria depende de varios factores, que incluyen: el método de administración, la enfermedad (p. ej., cáncer) que debe tratarse, la gravedad de la enfermedad, si el cáncer debe ser tratado o prevenido, y la edad, el peso y la salud del sujeto que se vaya a tratar.

Con respecto a los métodos de tratamiento descritos, no se pretende que la administración de un vector, conjugado o composición a un sujeto se limite a un modo particular de administración, dosificación o frecuencia de dosificación; La descripción contempla todos los modos de administración. El conjugado o la composición se puede administrar al sujeto en una dosis única o en dosis múltiples. Por ejemplo, un compuesto descrito o identificado en la presente memoria usando métodos de selección puede administrarse una vez a la semana durante, p.ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 o más semanas. Debe entenderse que, para cualquier sujeto en particular, se deben ajustar a lo largo del tiempo las pautas posológicas específicas según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administre o supervise la administración de la composición. Por ejemplo, se puede aumentar la dosis de una composición si la dosis más baja no proporciona suficiente actividad en el tratamiento de una enfermedad o afección descrita en la presente memoria (p. ej., cáncer). Por el contrario, la dosis de la composición puede reducirse si la enfermedad (p. ej., el cáncer) se reduce o se elimina.

Aunque, en última instancia, será el médico tratante quien decidirá la cantidad apropiada y la pauta posológica, una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector, un conjugado o una composición descritos en la presente memoria

- 5 puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,0035 μg a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día o de 0,010 μg a 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/semana. Deseablemente, una cantidad terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 0,025 μg a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por ejemplo, al menos 0,025, 0,035, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 o 9,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal administrados diariamente, cada dos días o dos veces a la semana. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz puede estar en el intervalo de 0,05 μg a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por ejemplo, al menos 0,05, 0,7, 0,15, 0,2, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 10,0, 12,0, 14,0, 16,0 o 18,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal administrados semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas o una vez al mes. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 mg/m^2 a 2.000 mg/m^2 administrados en días alternos, una vez por semana, cada dos semanas o cada tres semanas. Por ejemplo, ANG1005 se puede administrar a 50, 100, 200, 300, 400, 420, 500, 600, 700, 800 o 1.000 mg/m^2 cada una, dos, tres, cuatro semanas, o cada mes o cada dos meses. En un ejemplo particular, ANG1005 se administra a 300 mg/m^2 o 420 mg/m^2 cada tres semanas. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 1.000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a 20.000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, por ejemplo, al menos 1.000, 1.500, 4.000 o 14.000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ del compuesto administrado diariamente, cada dos días, dos veces a la semana, semanalmente o cada dos semanas.
- 10
- 15 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar más que limitar la invención.

Ejemplo 1

Solubilidad de ANG1005

La solubilidad de ANG1005 se ensayó en una serie de disolventes y tensioactivos. Los resultados de los agentes individuales se muestran en la Tabla 13 a continuación.

Tabla 13: Solubilización de ANG1005		
Lista de disolventes/tensioactivos ensayados como agentes individuales		
Disolventes/tensioactivos	Solubilidad	Concentración
Acetonitrilo (100 %)	No	
EtOH deshidratado	No	
metil- <i>terc</i> -butiléter	No	
Acetona	No	
Acetato de etilo	No	
Alcohol <i>terc</i> -butílico	No	
<i>N, N</i> -Dimetilacetamida	Sí	25 mg/ml
DMSO	Sí	120 mg/ml
Polisorbato 80 (Tween 80)	No	
Cremophor EL	No	
Cremophor ELP (BASF)	No	
PEG 300	No	
PEG	No	
PEG	No	
Polivinilpirrolidona (Kollidon 17)	No	
Polivinilpirrolidona (Kollidon 19)	No	
Ciclodextrina	No	
Labrafil	No	

- 20 También se ensayó la solubilidad de ANG1005 en combinaciones de disolvente/tensioactivo. Estos resultados se muestran en la Tabla 14.

ES 2 721 148 T3

4	5,25	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,8 (± 0,2)	42 °C
5	4,50	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,0 ±	46 °C
6	4,75	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,3 (± 0,2)	46 °C
7	5,00	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,5 (± 0,2)	46 °C
8	5,25	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,8 (± 0,2)	46 °C
9	4,50	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,0 ±	50 °C
10	4,75	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,3 (± 0,2)	50 °C
11	5,00	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,5 (± 0,2)	50 °C
12	5,25	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,8 (± 0,2)	50 °C
Piloto	pH final diana	pH de DMSO (5 %)	Solutol/tampón: 80/20 (25 %)	pH del Tampón (70 %)	Temperatura de calentamiento
13	4,50	4,0 (± 0,5)	pH = 5,0 (± 0,5)	5,0 (± 0,2)	50 °C
14	4,75	4,0 (± 0,5)	pH = 5,5 (± 0,5)	5,5 (± 0,2)	50 °C
15	5,00	4,0 (± 0,5)	pH = 6,0 (± 0,5)	5,5 (± 0,2)	50 °C
16	5,25	4,0 (± 0,5)	pH = 6,5 (± 0,5)	6,0 (± 0,2)	50 °C
Piloto	pH final diana	pH de DMSO (5 %)	Solutol/agua-HCl 80/20 (25 %)	pH del Tampón (70 %)	Temperatura de calentamiento
17	5,00	4,0 (± 0,5)	pH = 6,0 (± 0,5)	5,5 (± 0,2)	50 °C

En la siguiente Tabla 16, se muestran los resultados de estos experimentos.

Tabla 16

Piloto	pH diana	Pureza (%)	DMSO (ppm)*	Comentarios
1	4,50	95,9	5.855	rápida reconstitución transparente, luego turbia
2	4,75	94,0	6.488	rápida reconstitución transparente OK
3	5,00	95,0	6.256	rápida reconstitución transparente OK
4	5,25	95,4	6.382	rápida reconstitución transparente OK
5	4,50	96,0	6.818	rápida reconstitución transparente, luego turbia
6	4,75	94,4	6.330	rápida reconstitución transparente OK
7	5,00	94,6	6.806	rápida reconstitución transparente OK
8	5,25	94,0	6.930	rápida reconstitución transparente OK
9	4,50	95,2	6.235	rápida reconstitución transparente OK
10	4,75	93,8	6.932	rápida reconstitución transparente OK
11	5,00	95,1	6.302	rápida reconstitución transparente OK
12 (ref.)	5,25	93,9	7.846	rápida reconstitución transparente OK
13	4,50	97,6	7.035	reconst. turbia (++)

14	4,75	97,4	7.071	rápida reconstitución transparente, luego turbia y precipitado
15	5,00	95,4-94,3	6.818	rápida reconstitución transparente OK

Tabla 14: Solubilización de ANG1005		
Lista de disolventes/tensioactivos ensayados como combinación		
Disolventes/tensioactivos	Solubilidad	Concentración
EtOH/Tween 80	No	
EtOH/Cremophor EL	No	
EtOH/Cremophor ELP	No	
EtOH/PEG	No	
EtOH/Polivinilpirrolidona	No	
Solutol HS15/Tampón (con calentamiento de microondas)	Sí	6 mg/ml
EtOH/Solutol HS15/Tampón (75 °C)	Sí	6 mg/ml
DMSO/Solutol HS15/Tampón (50 °C)	Sí	6 mg/ml
DMSO/Tween80/Tampón (65 °C)	Sí	6 mg/ml
DMSO/Cremophor/Tampón (65 °C)	Sí	6 mg/ml

Ejemplo 2

Condiciones de solubilización de ANG1005

- 5 Se sometió ANG1005 a varias condiciones de solubilización en preparación para la liofilización. A continuación, se muestra un resumen de estos resultados. Como se ha descrito anteriormente, primero se disolvió el ANG1005 en DMSO. A esta mezcla, se añadió Solutol o la combinación de tampón y Solutol calientes. Finalmente, se añadió el tampón de glicina a la mezcla de ANG1005/DMSO/Solutol. Las condiciones de solubilización en la Tabla 15 se ensayaron de este modo.

10 Tabla 15: Solubilización de ANG1005

Piloto	pH final diana	pH de DMSO (5 %)	Solutol (20 %)	pH del Tampón (75 %)	Temperatura de calentamiento
1	4,50	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,0 (± 0,2)	42 °C
2	4,75	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,3 (± 0,2)	42 °C
3	5,00	4,0 (± 0,5)	Sin ajuste	4,5 (± 0,2)	42 °C
16	5,25	95,9-96,2	7155	rápida reconstitución transparente OK	
17	5,00	96,5	6163	reconst. turbia (++)	

Basándose en estos resultados, los presentes inventores han determinado que la formulación se puede procesar a temperaturas de entre 40 y 50 °C. El pH de la solución debe estar por encima de 4,5 para permitir la formación de micelas mediante el Solutol HS 15, ya que la reconstitución a pH 4,5 puede dar lugar a soluciones turbias. La acidificación del Solutol HS15 antes de añadir ANG1005 minimiza su degradación.

15 Ejemplo 3

Condiciones de liofilización

Tras la disolución, la mezcla de ANG1005 se diluyó en tampón acuoso (p. ej., tampón de glicina, pH ajustado a 5,0

con HCl, manitol y cloruro de sodio), se congeló y se liofilizó. Las condiciones ilustrativas se describen en la Tabla 4 anterior.

5 Se analizaron las temperaturas de carga de -70 °C a 25 °C para el segmento uno. El tiempo de rampa para el segmento 2 se varió de acuerdo con la diferencia entre las temperaturas en los segmentos 1 y 3, pudiendo ser de hasta seis horas. Se determinó que el segmento 3 debe realizarse durante al menos 12 horas, ya que los marcos temporales más cortos hicieron que la torta liofilizada se deshiciera. Los segmentos 8 y 9 se pueden ajustar dentro de las temperaturas que se muestran anteriormente para garantizar que la temperatura del producto estuviera entre 18 °C y 21 °C durante el secado secundario. El producto debe permanecer por debajo de 25 °C para evitar que se funda. Usando los protocolos de solubilización/liofilización descritos en la presente memoria, se pudo, en algunos casos, 10 generar un producto con una pureza superior al 96 % con menos del 1 % de DMSO residual, como se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17

Tabla 17: Resultados clave para el lote de GMP de ANG1005 para la inyección			
	C0807121	C0907124	C1007135
Pureza	93,3 %	90,9 %	96,5 %
Conjugado de 2:1	4,6 %	6,4 %	2,2 %
Ensayo	93,8 %	94,2 %	100,4 %
Agua	0,2 %	0,1 %	0,05 %
DMSO	8,2 %	2,4 %	0,6 %

En la siguiente Tabla 18, se muestra la caracterización adicional del lote 1007135 y de otros lotes.

Tabla 18

Número de lote	C1007135	C0108002	C0308011	C0608030	C1108062
Pureza	96,5 %	96,9 %	95,5 %	95,6 %	96,9 %
Conjugado de 2:1	2,2 %	1,4 %	2,0 %	2,7 %	2,3 %
Ensayo	100,4 %	97,2 %	100,7 %	102,6 %	105,7 %
Sustancias relacionadas totales	3,5 %	3,1 %	5,0 %	4,4 %	3,1 %
Angiopep-2 sin conjuguar	ND	ND	ND	ND	ND
Paclitaxel sin conjuguar	0,9 %	0,6 %	1,0 %	0,7 %	0,5 %
Conjugado de 1:1	ND	ND	ND	ND	ND
Desconocido	0,5 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %	0,4 %
Contenido de agua	0,05 %	0,04 %	0,05 %	0,12 %	0,03 %
DMSO	0,65 %	0,54 %	0,37 %	0,54 %	0,64 %

ND = No Detectado

15 **Ejemplo 4**

Resuspensión de ANG1005 liofilizado

El siguiente procedimiento se desarrolló para disolver y suspender la formulación liofilizada de ANG1005 en solución acuosa. El procedimiento descrito es apropiado para un solo vial que contiene 120 mg de ANG1005.

20 El vial de ANG1005 se equilibró a temperatura ambiente. Luego se ventiló el vial. Con una jeringa de 20 cm³ dotada de una aguja de 18G de aprox. 38 mm (1,5 pulgadas), se inyectaron lentamente 4 ml de etanol anhidro (es decir, durante 30 segundos) en el costado del vial. Luego, se colocó el vial en un mezclador de rotación durante 10 minutos, haciendo que el etanol humedeciera lentamente la torta, proporcionando así una suspensión lechosa.

Luego, se retiró el vial del mezclador y, con una jeringa de plástico de 20 cm³ ajustada a una aguja de 18G de aprox.

38 mm (1,5 pulgadas), se inyectaron 12 ml de lactato de Ringer con dextrosa al 5 % en el costado del vial. Luego, se colocó el vial en el mezclador de nutación durante 5 minutos. Luego, se centrifugó el vial 180 grados y después se siguió mezclando en el mezclador de nutación durante otros 5 minutos. En este punto, la suspensión era transparente con una mínima formación de espuma. El vial se dejó reposar en el banco durante cinco minutos antes de continuar con la siguiente etapa (p. ej., dilución para inyección, análisis).

También se ensayaron diluyentes alternativos (Tabla 19). Si bien el uso de estos diluyentes produjo una solución transparente con disolución completa, dio lugar a una mayor degradación de ANG1005 que la mezcla de lactato de Ringer con dextrosa al 5 % y etanol a temperatura ambiente.

Tabla 19: Diluyentes alternativos para la resuspensión:

	Cantidades	Condiciones
Agua para inyección	16 ml	Se calienta hasta 40-50 °C
Agua para inyección/etanol	12 ml + 4 ml	TA
D5W	16 ml	Se calienta hasta 40-50 °C
D5W/Etanol	12 ml + 4 ml	TA
lactato de Ringer-D5W	16 ml	Se calienta hasta 40-50 °C

Ejemplo 5

Prueba de tampones adicionales y agentes de carga

Se emprendieron esfuerzos adicionales con el objetivo de reducir el DMSO residual (0,5 %) y acortar el ciclo de liofilización (5 días).

Se cree que los diversos excipientes de la formulación (en especial, la glicina y el cloruro de sodio) produjeron una reducción en la eficacia de la eliminación de DMSO durante el secado secundario del ciclo. Las formulaciones preparadas sin NaCl, glicina, manitol o agua dieron lugar a un contenido de DMSO mucho más bajo (del orden del 0,01 %). Sin embargo, sin manitol, la torta era cerosa (que consistía principalmente en Solutol). Todas estas formulaciones de bajo DMSO fallaron en su reconstitución usando etanol y D5W/lactato de Ringer. Además, cuando la glicina no estaba presente, el pH no se controló. Esto dio lugar a la degradación de ANG1005.

Por lo tanto, en una prueba adicional, el manitol se mantuvo como un agente de carga, la glicina se reemplazó por tampones que incluían ácido cítrico y ácido láctico, y se eliminó el cloruro de sodio. Estas formulaciones, que usan un ciclo de liofilización más corto, todavía dieron lugar a tortas con DMSO residual al 0,05 %. En este nivel de DMSO, la torta no era soluble. En una formulación adicional, se usó lecitina de soja en lugar de manitol. Esto dio lugar a un DMSO residual del 0,2 %. Con un 0,2 % de DMSO residual, la torta fue soluble en etanol y D5W/LR. Por lo tanto, se cree que un mínimo de DMSO al 0,2-0,4 % puede ser necesario para la reconstitución de los viales y la dilución adicional en la bolsa de infusión. Por consiguiente, se puede ajustar el tiempo de liofilización para permitir concentraciones de DMSO en este intervalo.

Las composiciones usadas en estos ensayos se detallan a continuación (Tablas 20-22).

Tabla 20: Composición de preliofilización

% p/p	Proveedor	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		0,72	0,72	0,72	0,72
Solutol HS15		24,92	24,88	24,83	24,88
DMSO, USP	Gaylord	13,39	13,36	13,32	13,36
HCl 1 N		0,311	0,311	0,306	0,311
Ácido cítrico		0,04			
Ácido láctico**			0,21	0,42	0,21
Manitol		1,54	1,53	1,53	
Lecitina de soja	PL90G				1,53

ES 2 721 148 T3

% p/p	Proveedor	F-37	F-38	F-39	F-40
Agua para inyección		59,08	59,00	58,86	59,00
Total		100,00	100,00	100,00	100,00

** 85 % en agua

La proporción de Solutol/IFA es igual que la del registro del lote de ANG

La proporción de DMSO/HCl es igual que la del registro del lote de ANG

La conc. de ácido cítrico se selecciona para proporcionar un pH 5 (basado en F-34)

La conc. de ácido láctico se selecciona para proporcionar un pH 5 (F38) e inferior (F39)

La conc. de manitol en agua es la misma que en el registro del lote de ANG

La lecitina de soja es un agente de carga "solubilizante" para reemplazar al manitol

Tabla 21: Tabla de preparación de compuestos

mg/tubo	Grado y Lote	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		184	184	184	184
Solutol HS15		6.328	6.328	6.328	6.328
DMSO, USP		3.399	3.399	3.395	3.399
HCl 1 N		79	79	78	79
Ácido cítrico		10			
Ácido láctico**			54	108	54
Manitol		390	390	390	
Lecitina de soja					390
Agua para inyección		15.000	15.000	15.000	15.000
Total		25.390	25.434	25.483	25.434
Peso seco total		6.991	7.035	7.088	7.035

** 85 % en agua

Tabla 22: Tabla de composiciones tras la liofilización

% p/p	Proveedor	F-37	F-38	F-39	F-40
ANG1005		2,64	2,62	2,60	2,62
Solutol HS15		90,65	89,95	89,28	89,95
DMSO, USP	Gaylord				
HCl 1 N		1,13	1,12	1,10	1,12
Ácido cítrico		0,14			
Ácido láctico**			0,77	1,52	0,77
Manitol		5,59	5,54	5,50	
Lecitina de soja					5,54
Agua para inyección					

Total		100,0	100,0	100,0	100,0
-------	--	-------	-------	-------	-------

** 85 % en agua

Las composiciones se prepararon de la siguiente manera: La reserva de DMSO/HCl se preparó pesando 0,5 g de solución patrón de HCl 1 N en un tubo Falcon de 50 ml. Se añadieron 21,5 g DMSO y se mezcló bien, obteniéndose la reserva de DMSO + HCl 1 N.

5 Para cada composición, se pesaron manitol, Solutol, ácido cítrico o ácido láctico y WFI, y se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml. Se mezcló bien el contenido para disolver. Los tubos se taparon y se calentaron hasta 51 °C (“mezcla de tampón”). Se usaron otros 50 ml para pesar el ANG1005. A continuación, se añadió la reserva de DMSO/HCl y se mezcló bien con formación de vórtice hasta que la solución se aclaró. La mezcla de tampón calentada se añadió lentamente a la mezcla de DMSO/ANG1005 mientras se agitaba con formación de vórtice. Las mezclas se enfriaron luego hasta la temperatura ambiente. Luego, se colocaron 1.700-1.730 mg de la solución en cada vial. La solución se liofilizó como se describe en la presente memoria. El compuesto se almacenó a -20 °C.

10 Las soluciones se ensayaron luego para determinar su capacidad de reconstitución. Para reconstituir las soluciones, se añadió etanol y se mezcló. Luego, se añadió la solución de lactato de Ringer. En la Tabla 23, se muestran cantidades.

Tabla 23: Volumen de reconstitución

peso por vial	Producto de referencia	de F-37 a F-40
IFA (mg)	125	12,5
Etanol (mg)	3.234	323,4
Lactato de Ringer con D5W (mg)	12.186	1.218,6

15 Si la reconstitución es exitosa, entonces se registrará el aspecto de la muestra (color, cristal o PPT sólido bajo microscopio, etc.). Luego, se analizaría una alícuota mediante HPLC (p. ej., ensayo y pureza). También se mediría el pH.

Ejemplo 6

Prueba de estabilidad del producto ANG1005 liofilizado

20 Se están realizando pruebas de estabilidad a lo largo del tiempo del producto ANG1005. El producto liofilizado, que se está almacenando a aproximadamente -15 °C, se controló para determinar su actividad, pureza, aspecto, pH y degradación. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente Tabla 24.

Tabla 24: Resultados de estabilidad para ANG1005 para inyección, Número de lote C1007135 almacenado a -15 ± 5 °C								
ANG1005 para inyección. Número de lote C1007135 Fecha de fabricación: octubre de 2007					Concentración: 120 mg/vial de ANG1005			
Envase: vial de 60 ml, con un tapón Daikyo de 15 mm y un precinto Flip-off de 15 mm					Fecha de inicio del estudio de estabilidad: noviembre de 2007 Duración del estudio: 24 meses			
Ensayos	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	16 meses
Aspecto	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta
Claridad e integridad de la solución	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta
pH	5,2	5,9	5,5	5,5	5,5	5,8	5,8	5,7
Contenido de agua	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	ND	ND	0,1 %
Ensayo (p/p)	100,4 %	97,6 %	98,4 %	97,5 %	93,7 %	103,3 %	103,5 %	101,3 %

<p align="center">Tabla 24: Resultados de estabilidad para ANG1005 para inyección, Número de lote C1007135 almacenado a -15 ± 5 °C</p>								
ANG1005 para inyección. Número de lote C1007135					Concentración: 120 mg/vial de ANG1005			
Fecha de fabricación: octubre de 2007					Fecha de inicio del estudio de estabilidad: noviembre de 2007 Duración del estudio: 24 meses			
Envase: vial de 60 ml, con un tapón Daikyo de 15 mm y un precinto Flip-off de 15 mm								
Ensayos	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	16 meses
Pureza	96,5 %	97,4 %	97,2 %	96,7 %	96,2 %	97,3 %	97,4 %	97,2 %
Conjugado de 2:1	2,2 %	1,4 %	1,5 %	1,5 %	1,4 %	1,3 %	1,2 %	1,4 %
Paclitaxel	0,9 %	0,6 %	0,7 %	0,6 %	1,1 %	0,5 %	0,5 %	0,6 %
Desconocido	0,5 %	0,4 %	0,4 %	1,2 %	1,3 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %
Sustancias rel.								
TRR de imp 0,60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TRR de imp 0,61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TRR de imp 0,62	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TRR de imp 0,64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TRR de imp 0,66	0,1 %	ND	ND	ND	0,1 %	ND	ND	ND
TRR de imp 0,79	ND	ND	ND	0,3 %	0,2 %	ND	ND	0,2 %
TRR de imp 0,83	ND	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,1 %	ND	ND	ND
TRR de imp 0,91	0,2 %	ND	ND	ND	0,2 %	ND	0,2 %	0,1 %
TRR de imp 0,93	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,2 %	0,2 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
TRR de imp 0,95	0,1 %	0,1 %	ND	0,2 %	ND	ND	ND	ND
TRR de imp 0,98								
TRR de imp 1,03								
TRR de imp 1,04								

Tabla 24: Resultados de estabilidad para ANG1005 para inyección, Número de lote C1007135 almacenado a -15 ± 5 °C								
ANG1005 para inyección. Número de lote C1007135 Fecha de fabricación: octubre de 2007					Concentración: 120 mg/vial de ANG1005			
Envase: vial de 60 ml, con un tapón Daikyo de 15 mm y un precinto Flip-off de 15 mm					Fecha de inicio del estudio de estabilidad: noviembre de 2007 Duración del estudio: 24 meses			
Ensayos	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	16 meses
TRR de imp 1,06								
TRR de imp 1,07								
Esterilidad	Estéril	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	Estéril	N/Ap
Materia particulada	Se ajusta	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	N/Ap	Se ajusta	N/Ap

Ejemplo 7**Estabilidad del producto ANG1005 tras la reconstitución**

Se han realizado varios experimentos para evaluar la estabilidad de ANG1005 después de la reconstitución en solución. Estos experimentos se describen a continuación.

5 Experimento 1

El producto del número de lote C0108002 de ANG1005 para inyección se reconstituyó como se describe en la presente memoria a un intervalo de concentración de 1,0 a 2,0 mg/ml. La concentración de 2,0 mg/ml de ANG1005 se había determinado previamente como la dosis más alta posible para uso clínico como se presentó anteriormente en la IND. Estos experimentos preliminares se realizaron en pequeños volúmenes en viales de vidrio. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y se examinaron visualmente en los distintos puntos temporales. Las muestras seleccionadas se filtraron antes del análisis por HPLC.

La Tabla 25 muestra la claridad visual de las soluciones en las concentraciones ensayadas a lo largo del tiempo. El aspecto turbio parece correlacionarse con el aumento de la concentración y el tiempo. El análisis por HPLC de muestras seleccionadas reveló un solo máximo de ANG1005 que no cambió significativamente la pureza en los distintos puntos de tiempo. No se observaron cambios en el perfil de las sustancias relacionadas (Tabla 26). Se anotan dos máximos de sustancias relacionadas y se identifican como el conjugado de 2:1 (TRR 0,88) y paclitaxel no conjugado (TRR 0,95). Se observó un máximo con un TRR de 1,15 (8,1 minutos); este máximo es una impureza de la columna de HPLC, ya que también está presente en los cromatogramas en blanco.

Tabla 25: Aspecto visual de ANG1005 reconstituido diluido en D5W

	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h
1,0 mg/ml	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	X
1,5 mg/ml	Transparente	Transparente	X	X	XX	XXX
2,0 mg/ml	Transparente	X	XX	XX	XXX	XXX

X: Ligeramente turbio

XX: Turbio

XXX: Muy turbio

20

Tabla 26: Pureza de ANG1005 reconstituido para inyección diluida en D5W

	0 h	1,5 h	3,5 h	6 h
1,0 mg/ml	97,3 % Sustancias relacionadas: 1,3 % (0,88) 1,4 % (0,95)	NE	97,1 % Sustancias relacionadas: 1,4 % (0,88) 1,5 % (0,95)	NE
1,5 mg/ml	97,3 % Sustancias relacionadas: 1,3 % (0,88) 1,4 % (0,95)	97,1 % Sustancias relacionadas: 1,4 % (0,88) 1,5 % (0,95)	NE	96,8 % Sustancias relacionadas: 1,5 % (0,88) 1,7 % (0,95)
2,0 mg/ml	97,2 % Sustancias relacionadas: 1,3 % (0,88) 1,5 % (0,95)	97,1 % Sustancias relacionadas: 1,4 % (0,88) 1,5 % (0,95)	NE	NE

NE = No Ensayado

Sustancias relacionadas: Presentan un solo máximo superior al 0,5 % con un tiempo de retención relativo entre paréntesis

La sustancia relacionada a un TRR de 0,88 representa el conjugado de 2:1

La sustancia relacionada a un TRR de 0,95 representa el paclitaxel no conjugado

Nota: Se observa un máximo con un tiempo de retención relativo de 1,15 (8,1 min); este máximo es una impureza de la columna de HPLC, ya que también está presente en el cromatograma en blanco.

Experimento 2

5 Para verificar los resultados de estabilidad a 1,0 mg/ml que se obtuvieron en el Experimento 1, se realizó un estudio adicional en las condiciones de uso clínico. El ANG1005 para inyección, número de lote C0108002, se reconstituyó como se describe para preparar una concentración final de 1,0 mg/ml en la bolsa de infusión de D5W de 500 ml. La solución se mantuvo visualmente clara durante el período de observación de 6 horas a temperatura ambiente sin cambios significativos en la pureza ni en los perfiles de sustancias relacionadas (véase la Tabla 27 y Figura 2).

Tabla 27: Pureza de ANG1005 reconstituido para inyección diluido con D5W a 1,0 mg/ml en condiciones de uso clínico

Tiempo	0 h	2 h	4 h	6 h
Pureza	97,4 %	97,3 %	97,0 %	97,2 %
	Sustancias relacionadas:	Sustancias relacionadas:	Sustancias relacionadas:	Sustancias relacionadas:
	1,2 % (0,88) 1,4 % (0,95)	1,3 % (0,88) 1,4 % (0,95)	1,5 % (0,88) 1,5 % (0,95)	1,4 % (0,88) 1,4 % (0,95)

Sustancias relacionadas: Presentan un solo máximo superior al 0,5 % con un tiempo de retención relativo entre paréntesis.

La sustancia relacionada a un TRR de 0,88 representa el conjugado de 2:1

La sustancia relacionada a un TRR de 0,95 representa el paclitaxel no conjugado

Nota: Se observa un máximo con un tiempo de retención relativo de 1,15 (8,1 min); este máximo es una impureza de la columna de HPLC, ya que también está presente en el cromatograma en blanco.

Experimento 3

5 El ANG1005 para inyección, número de lote C0108002, se reconstituyó y se diluyó en D5W hasta una concentración final de 2,0 mg/ml en un vial de vidrio. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante aproximadamente ~6 h. La solución se volvió turbia y se centrifugó. El sedimento resultante se recogió decantando el sobrenadante, se solubilizó en DMSO y se analizó mediante HPLC. El máximo principal del sedimento vuelto a solubilizar se identificó como ANG1005 con una pureza del 97,2 %. No se observaron cambios en el perfil de las sustancias relacionadas y solo estaban presentes los 2 máximos adicionales esperados (1,3 % a un TRR de 0,88 y 1,5 % a un TRR de 0,95). El cromatograma de HPLC de esta muestra se muestra en la Figura 3. Se observó un máximo con un TRR de 1,15 (8,1 minutos); este máximo es una impureza de la columna de HPLC, y también está presente en los cromatogramas en blanco.

10 Los datos en conjunto indican que la turbidez/opacidad observada es el resultado de que salga ANG1005 intacto de la solución sin ninguna degradación, probablemente debido a una interacción entre los componentes del producto farmacológico y D5W. Este fenómeno parece ser dependiente de la concentración y del tiempo.

15 Para reducir la turbidez, se sugirió una reducción de la concentración final hasta ≤1 mg/ml para todos los pacientes que recibieron dosis de ANG1005 >300 mg/m².

20 Hay algunos datos que sugieren que este hallazgo se debe principalmente a la reducción de la cantidad de DMSO residual en el producto farmacológico. El primer lote de producto farmacológico, número de lote C0807121, tenía un contenido residual de DMSO del 8,2 %, mientras que un lote más reciente, número de lote C0108002, tiene un contenido residual de DMSO del 0,54 %. Parece que este cambio puede haber afectado a la solubilidad de la sustancia.

25 Se están realizando experimentos adicionales para modificar el procedimiento de dilución con el fin de aumentar la estabilidad del fármaco reconstituido. Se están ensayando soluciones preparadas con lactato de Ringer en lugar de inyección de dextrosa al 5 % como diluyente en la última etapa del proceso de reconstitución: cada vial de ANG1005 para inyección se reconstituirá primero con inyección de 4 ml de etanol anhidro y 12 ml de lactato de Ringer/dextrosa al 5 % como antes para lograr una concentración de 6 mg/ml, y luego se diluirá aún más con la inyección de lactato de Ringer. Los datos preliminares, que se muestran en la Tabla 28, sugieren que el reemplazo de D5W por lactato de Ringer en el mismo intervalo de concentración (hasta 2,0 mg/ml) puede prevenir la turbidez observada de las soluciones de infusión. Todas las soluciones permanecieron transparentes durante todo el período de observación sin afectar a la pureza de ANG1005.

30 **Tabla 28: Pureza de ANG1005 reconstituido para inyección diluido con inyección de lactato de Ringer**

	0 h	1 h	2 h	4 h
0,5 mg/ml	97,2 % Sustancias relacionadas: 1,4 % (0,88) 1,4 % (0,95)	96,9 % Sustancias relacionadas: 1,5 % (0,88) 1,6 % (0,95)	96,7 % Sustancias relacionadas: 1,7 % (0,88) 1,6 % (0,95)	96,3 % Sustancias relacionadas: 2,0 % (0,88) 1,7 % (0,95)
1,0 mg/ml	96,8 % Sustancias relacionadas: 1,6 % (0,88) 1,6 % (0,95)	96,7 % Sustancias relacionadas: 1,7 % (0,88) 1,6 % (0,95)	96,6 % Sustancias relacionadas: 1,8 % (0,88) 1,6 % (0,95)	96,6 % Sustancias relacionadas: 1,8 % (0,88) 1,6 % (0,95)
1,5 mg/ml	97,0 % Sustancias relacionadas: 1,5 % (0,88) 1,5 % (0,95)	96,9 % Sustancias relacionadas: 1,6 % (0,88) 1,5 % (0,95)	96,6 % Sustancias relacionadas: 1,8 % (0,88) 1,6 % (0,95)	96,6 % Sustancias relacionadas: 1,8 % (0,88) 1,6 % (0,95)

ES 2 721 148 T3

2,0 mg/ml	97,1 %	96,8 %	96,6 %	96,6 %
	Sustancias relacionadas:	Sustancias relacionadas:	Sustancias relacionadas:	Sustancias relacionadas:
	1,4 % (0,88) 1,5 % (0,95)	1,6 % (0,88) 1,6 % (0,95)	1,8 % (0,88) 1,6 % (0,95)	1,8 % (0,88) 1,6 % (0,95)

Sustancias relacionadas: Presentan un solo máximo superior al 0,5 % con un tiempo de retención relativo entre paréntesis.

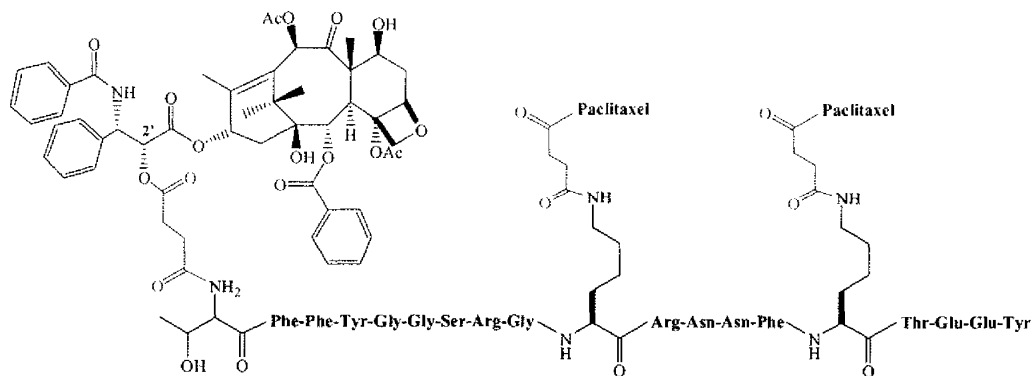
La sustancia relacionada a un TRR de 0,88 representa el conjugado de 2:1

La sustancia relacionada a un TRR de 0,95 representa el paclitaxel no conjugado

REIVINDICACIONES

1. Una composición liofilizada que comprende:

(a) ANG1005, en donde ANG1005 tiene la estructura:



5 (b) un agente de tonicidad opcional;

(c) un agente de tamponamiento;

(d) un agente de carga;

(e) un agente solubilizante, en donde dicho agente solubilizante es un éster de polioxietileno de un ácido graso; y

(f) del 0,2 al 10 % de DMSO.

10 2. La composición liofilizada de la reivindicación 1, en donde dicho agente de tonicidad es cloruro de sodio;

en donde dicho agente de tamponamiento es glicina, ácido cítrico o ácido láctico;

en donde dicho agente solubilizante es Solutol HS 15;

en donde dicho agente de carga es manitol o sorbitol;

15 en donde la cantidad de DMSO es inferior al 5 %, más concretamente, inferior al 1 %, incluso más concretamente es de entre el 0,2 % y el 1,0 %;

y/o

en donde dicha composición está esencialmente libre de aceite de ricino polioxietilado, en particular, en donde dicha composición está libre de aceite de ricino polioxietilado.

3. La composición liofilizada de la reivindicación 1, que comprende:

Compuesto	Porcentaje (en peso sin agua)
ANG1005	0,1-5 %
Agente de tonicidad	1-15 %
Agente de tamponamiento	1-10 %
Agente de carga	0-15 %
Solutol HS 15	40-75 %
DMSO	0,2-10 %

20 4. La composición liofilizada de la reivindicación 3, que comprende:

Compuesto	Porcentaje (en peso sin agua)
ANG1005	1,8-2,3 %
Agente de tonicidad	9-11 %

Tampón	4,5-6 %
Agente de carga	8-10 %
Solutol HS 15	69-75 %
DMSO	0,2-2

5. La composición liofilizada de la reivindicación 3 o 4, en donde dicho agente de tonicidad es cloruro de sodio, dicho agente de tamponamiento es glicina y dicho agente de tamponamiento es manitol.

6. La composición liofilizada de la reivindicación 1, que comprende:

Compuesto	Porcentaje (en peso sin agua)
ANG1005	1,8-4,0 %
Tampón	0,1-6 %
Agente de carga	2-10 %
Solutol HS 15	80-95 %
DMSO	0,2-1 %

5 7. La composición liofilizada de la reivindicación 6, en donde dicho tampón es ácido láctico o ácido cítrico, y dicho agente de carga es manitol.

10 8. La composición liofilizada de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que lo necesita dicha composición en una cantidad suficiente para tratar dicho cáncer, en particular, en donde dicho cáncer es un cáncer de cerebro, ovárico, pulmón, hígado, bazo o riñón, más concretamente, en donde dicho cáncer cerebral se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, astrocitoma, glioma, meduloblastoma y oligodendroma, neuroglioma, ependimoma y meningioma.

9. Un recipiente cerrado herméticamente que contiene la composición liofilizada de la reivindicación 5.

10. Un kit que comprende:

(a) el recipiente cerrado herméticamente de la reivindicación 5; y

15 (b) instrucciones para su uso.

11. Un método de preparación de una composición farmacéutica liofilizada de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método:

(a) disolver dicho conjugado en un primer agente solubilizante para formar una mezcla;

(b) añadir un segundo agente solubilizante a la mezcla de la etapa (a);

20 (c) opcionalmente, añadir agua y un agente de tamponamiento a dicha mezcla;

(d) liofilizar la mezcla de la etapa (c); en donde dicha liofilización produce una reducción de al menos el 20 % de la cantidad de dicho primer agente solubilizante, pero no reduce sustancialmente la cantidad de dicho segundo agente solubilizante.

12. El método de la reivindicación 11, en donde dicho primer agente solubilizante es DMSO;

25 en donde dicho segundo agente solubilizante es un éster de polioxietileno de un ácido graso, en particular, Solutol HS 15;

en donde la mezcla de la etapa (b) se filtra antes de la liofilización de la etapa (c);

en donde dicha mezcla se coloca en un vial antes de la liofilización de la etapa (c);

en donde dicho método comprende además la etapa (e) de resuspender dicho producto liofilizado.

30 13. El método de la reivindicación 12, en donde el agua y un agente de tamponamiento se añaden en la etapa (c), y dicha liofilización de la etapa (d) comprende:

- (i) congelar dicha mezcla;
 - (ii) secar dicho producto congelado a una primera temperatura y presión suficientes para eliminar al menos una parte de dicho agua; y
 - (iii) secar dicho producto a una segunda temperatura y presión suficientes para eliminar al menos una parte de dicho disolvente,
- 5 en particular, en donde dicho primer disolvente es DMSO y dicho segundo disolvente es Solutol HS 15.

Diagrama de flujo del proceso de fabricación del producto farmacológico

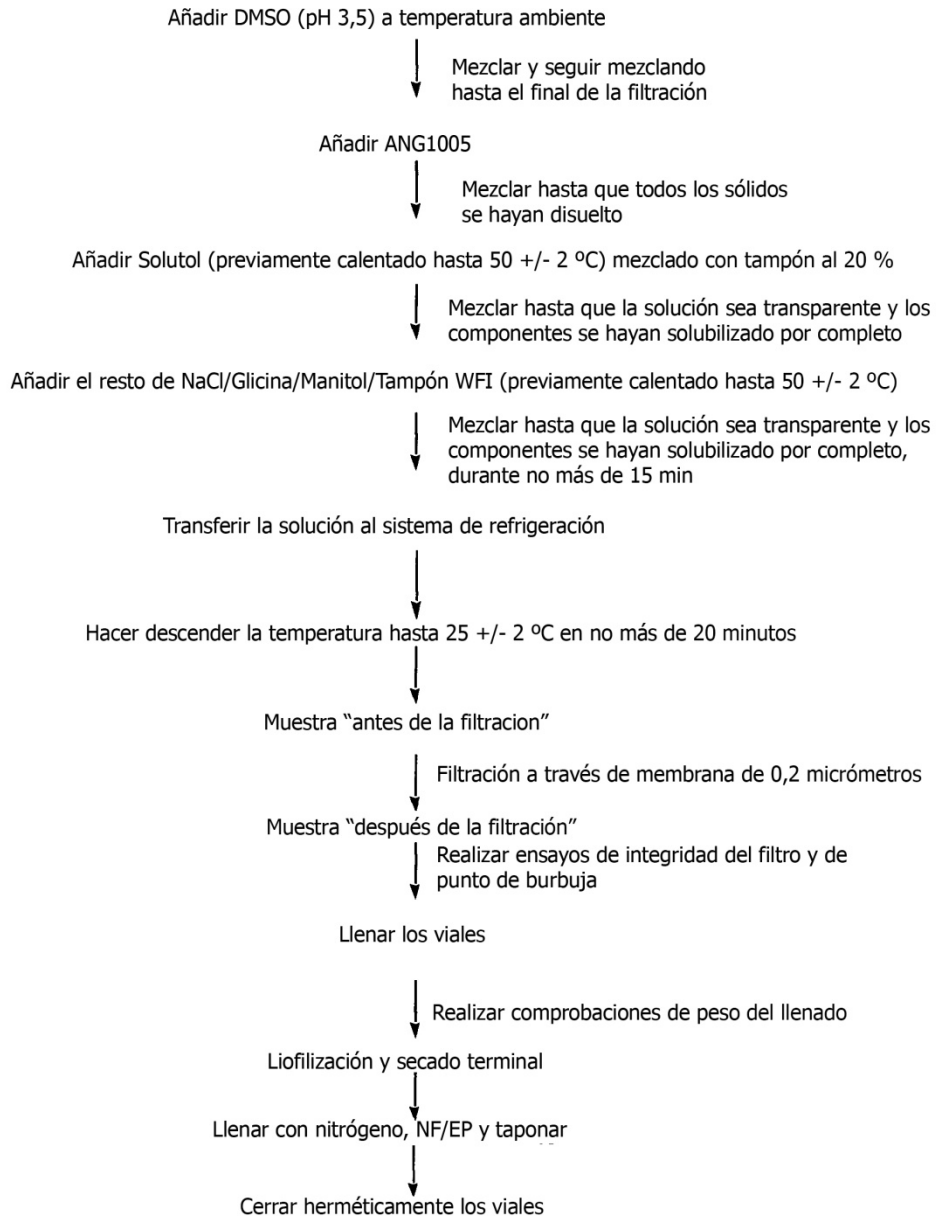
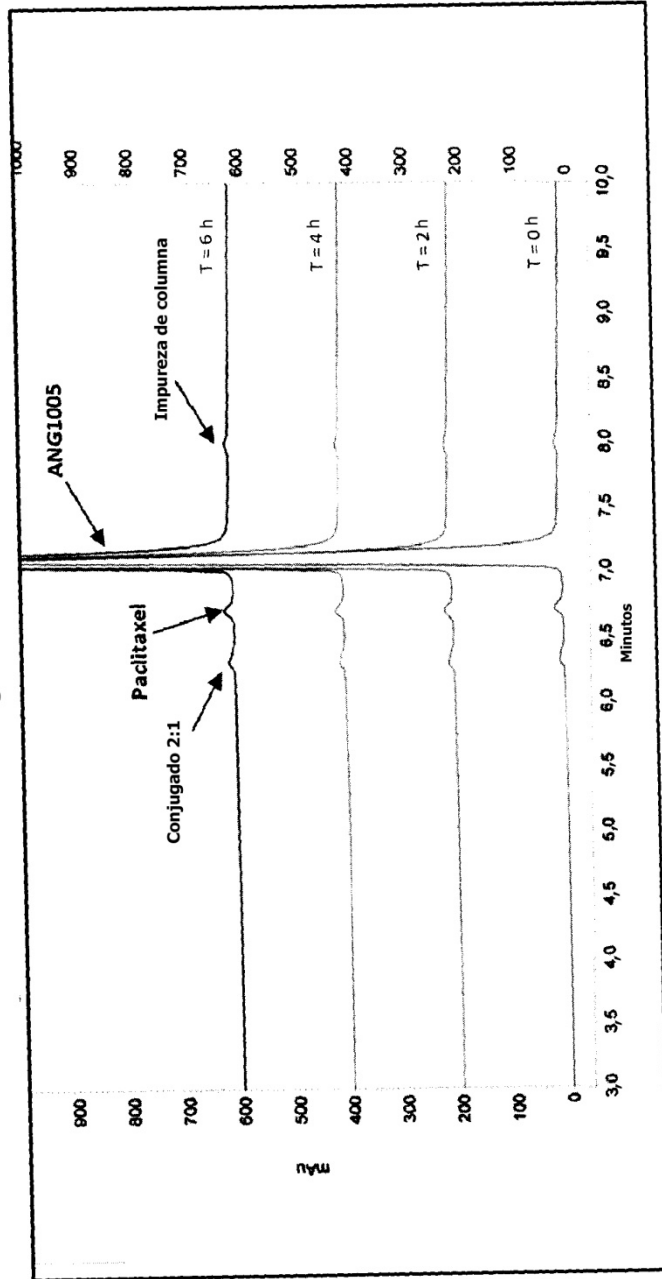


Figura 1

Figura 2



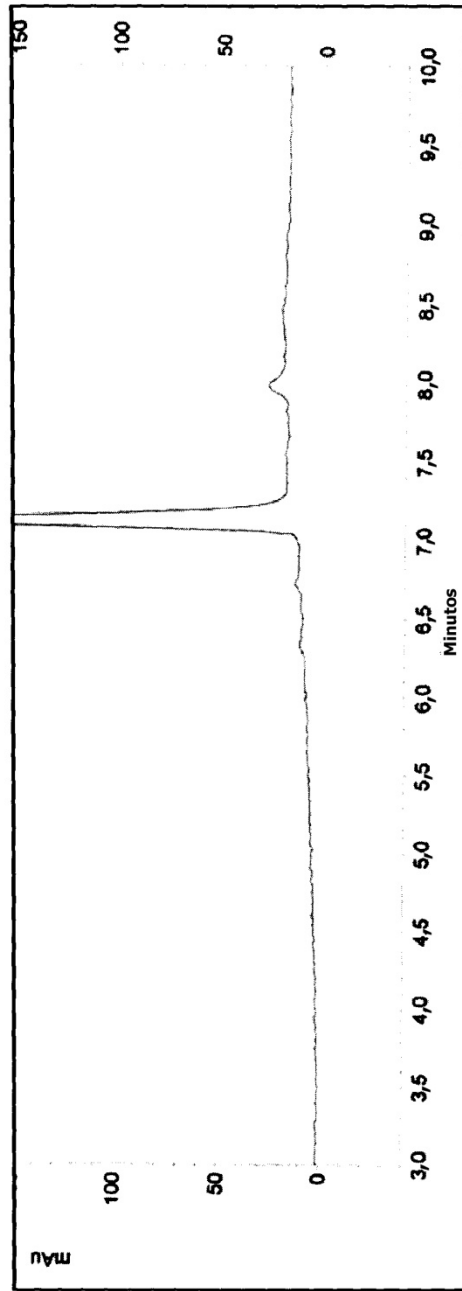


Figura 3