

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 397**

51 Int. Cl.:

A61K 47/59 (2007.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2014 PCT/US2014/060181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15054669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2014 E 14802528 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3054992**

54 Título: **Conjugados de proteína-polímero-fármaco**

30 Prioridad:

11.10.2013 US 201361890065 P
04.04.2014 US 201461975290 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2020

73 Titular/es:

ASANA BIOSCIENCES, LLC (100.0%)
400 Crossing Boulevard, Third Floor
Bridgewater, NJ 08807-2863, US

72 Inventor/es:

SMITH, ROGER A.;
DAMLE, NITIN K.;
YURKOVETSKIY, ALEKSANDR V.;
YIN, MAO;
LOWINGER, TIMOTHY B.;
THOMAS, JOSHUA D.;
STEVENSON, CHERI A. y
GURIJALA, VENU R.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 754 397 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de proteína-polímero-fármaco

Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de las Solicitudes Provisionales U.S. Nos. 61/890,065, presentada el 11 de octubre de 2013, titulada Protein-Polymer-Drug Conjugates, y 61/975,290, presentada el 4 de abril de 2014, titulada Protein-Polymer-Drug Conjugates.

Antecedentes de la invención

10 Tradicionalmente, los productos farmacéuticos han consistido principalmente en pequeñas moléculas que se dispensan por vía oral (como pastillas sólidas y líquidos) o como inyectables. Durante las últimas tres décadas, las formulaciones (es decir, las composiciones que controlan la ruta y/o la tasa de suministro del fármaco y permiten el suministro del agente terapéutico en el sitio donde se necesita) se han vuelto cada vez más comunes y complejas. No obstante, quedan por resolver muchas preguntas y desafíos relacionados con el desarrollo de nuevos tratamientos, así como los mecanismos con los cuales administrarlos. Por ejemplo, muchos fármacos exhiben potencias y efectos terapéuticos limitados o reducidos, ya que generalmente están sujetos generalmente a una degradación parcial antes de que alcancen un objetivo deseado en el cuerpo, o se acumulen en tejidos distintos del objetivo, o ambos.

15 Por lo tanto, un objetivo en el campo de los sistemas de suministro de fármacos es suministrar medicamentos intactos a específicamente áreas direccionadas del cuerpo a través de un sistema que pueda estabilizar el fármaco y controlar la transferencia in vivo del agente terapéutico utilizando mecanismos fisiológicos o químicos, o ambos.

20 Los conjugados de anticuerpo-fármaco se han desarrollado como agentes terapéuticos específicos del objetivo. Los anticuerpos contra diversos antígenos de la superficie de las células cancerosas se han conjugado con diferentes agentes citotóxicos que inhiben varias dianas celulares esenciales tales como los microtúbulos (maitansinoides, auristatinas, taxanos: patentes U.S. Nos. 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,441,163; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,596,757; y 7,276,497); ADN (caliqueamicina, doxorubicina, análogos de CC-1065; patentes U.S. Nos. 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545; 6,534,660; 6,756,397; y 6,630,579). Los conjugados de anticuerpos con algunos de estos fármacos citotóxicos están siendo investigados activamente en la clínica para la terapia del cáncer (Ricart, AD and Tolcher, AW, 2007, Nature Clinical Practice, 4, 245-255; Krop et al., 2010, J. Clin. Oncol., 28, 2698-2704). Sin embargo, los conjugados de anticuerpo-fármaco existentes han exhibido algunas limitaciones. Una limitación importante es su incapacidad para suministrar una concentración suficiente de fármaco en el sitio objetivo debido al número limitado de antígenos direccionados y la citotoxicidad relativamente moderada de los fármacos contra el cáncer como metotrexato, daunorubicina, maitansinoides, taxanos y vincristina. Una metodología para lograr una citotoxicidad significativa es mediante el enlace de un gran número de moléculas de fármaco, ya sea directa o indirectamente al anticuerpo. Sin embargo, tales anticuerpos altamente modificados a menudo muestran una unión dañada al antígeno diana y una rápida eliminación in vivo del torrente sanguíneo. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar la capacidad de suministrar una concentración suficiente de un fármaco al objetivo de tal manera que se logre la máxima citotoxicidad para el fármaco.

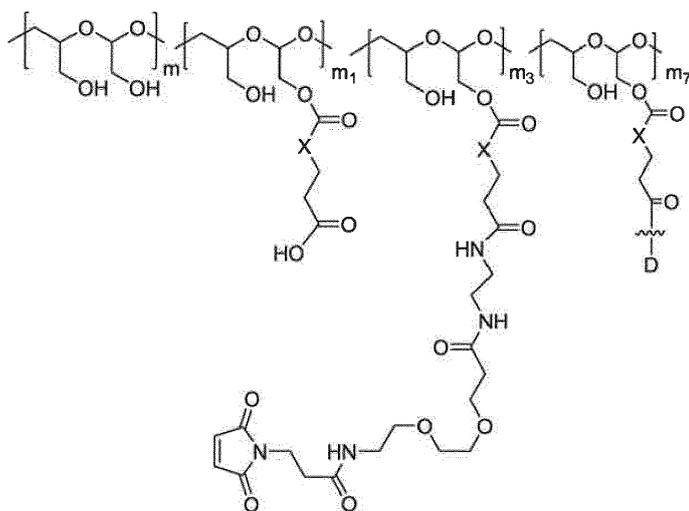
35 El documento WO 2012/171020 analiza un fármaco conjugado que comprende una molécula de reconocimiento basada en proteínas (PBRM) y un vehículo polimérico sustituido con uno o más -L^D-D, estando conectada la molécula de reconocimiento basada en proteínas al vehículo polimérico por L^P.

40 "Development of novel linkers to conjugate pharmacophores to a carrier antibody," Moorthy S. Palanki, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Pergamon, Amsterdam, NL (vol. 22, no. 13, May 8, 2012, páginas 4249-4253) describe novedosos enlazadores de maleimida modificados con estabilidad química mejorada que podrían usarse potencialmente para conjugar diversos farmacóforos tales como oligonucleótidos, péptidos y proteínas con anticuerpos para proporcionar novedosos productos biológicos con beneficios terapéuticos bien definidos y propiedades farmacocinéticas mejoradas.

45 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un conjugado de proteína-polímero-fármaco que es biodegradable, biocompatible y que exhibe una alta carga de fármaco, así como una fuerte unión al antígeno diana. Se describe además un armazón polimérico útil para conjugar con una molécula de reconocimiento basada en proteínas (PBRM) para obtener el conjugado de proteína-polímero-fármaco.

50 También se describe en este documento un armazón polimérico de Fórmula (Id) útil para conjugar con una molécula de reconocimiento basada en proteínas (PBRM):



(Id),

en donde:

el armazón comprende poli(1-hidroximetil-etilén hidroximetil-formal) (PHF) que tiene un peso molecular que varía desde 2 kDa a aproximadamente 40 kDa;

- 5 cada presencia de D es independientemente un agente terapéutico que tiene un peso molecular de ≤ 5 kDa, y la



entre D y el grupo carbonilo denota la unión directa o indirecta de D al grupo carbonilo,

X es CH₂, O, o NH;

m es un entero de 1 a aproximadamente 300,

- 10 m₁ es un entero de 1 a aproximadamente 140,

m₇ es un entero de 1 a aproximadamente 40,

m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 18, y

la suma de m, m₁, m₃, y m₇ varía de 15 a aproximadamente 300.

El armazón de Fórmula (Id) puede incluir una o más de las siguientes funciones:

- 15 Cuando el PHF en la Fórmula (Id) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa, m₇ es un entero de 1 a aproximadamente 20, m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 10, m₁ es un entero de 1 a aproximadamente 70 y la suma de m, m₁, m₃ y m₇ varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 150.

- 20 Cuando el PHF en la Fórmula (Id) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa, m₇ es un entero de 2 a 15, m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 8, m₁ es un entero de 2 a aproximadamente 50 y la suma de m, m₁, m₃ y m₇ varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 110.

Cuando el PHF en la Fórmula (Id) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, m₇ es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 5, m₁ es un entero de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 y la suma de m, m₁, m₃ y m₇ varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75.

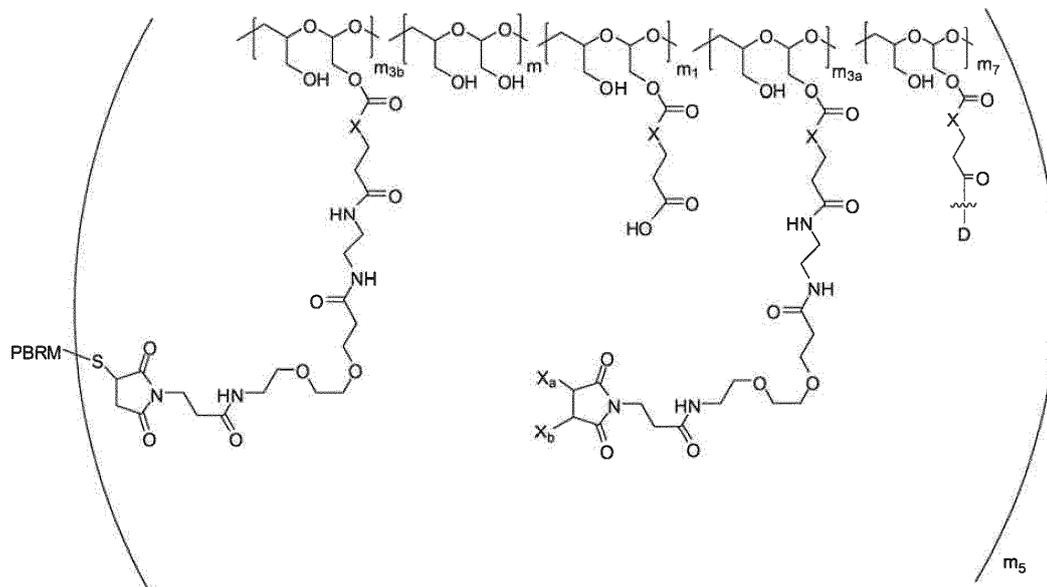
- 25 Cada presencia de la unidad estructural maleimido en la unidad "m₃" de Fórmula (Id) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.

La suma de m₁ y m₇ puede ser un entero de 2 a aproximadamente 180.

- 30 El armazón de Fórmula (Id) puede comprender además una PBRM conjugada con el armazón que contiene D a través de uno o más grupos maleimido del armazón que contiene D formando un conjugado de proteína-polímero-fármaco. Por ejemplo, el armazón de Fórmula (Id) comprende además una PBRM conjugada con el armazón que contiene D a

través de dos o más grupos maleimido (por ejemplo, hasta cinco) del armazón. Por ejemplo, una PBRM está conectada a uno o más armazones poliméricos que contienen D de Fórmula (Id).

En algunas disposiciones, el conjugado de fármaco polimérico (Id) cuando se conjuga con una PBRM es de Fórmula (Ie):



(Ie),

5

en donde:

uno de X_a y X_b es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido, o X_a y X_b , junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un doble enlace carbono-carbono;

m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 17,

10 m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8, en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es m_3 ,

la suma de m , m_1 , m_7 , m_{3a} , y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300, y

m_5 es un entero de 1 a aproximadamente 10.

En el conjugado de proteína-polímero-fármaco de Fórmula (Id), cada D puede ser la misma o diferente unidad estructural y cada PBRM puede ser la misma o diferente unidad estructural.

15 En ciertas realizaciones, la relación entre D y PBRM puede ser aproximadamente 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 o 6:1.

En algunas realizaciones, la relación entre D y PBRM puede ser aproximadamente 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 o 10:1.

20 En otras realizaciones, la relación entre D y PBRM puede ser aproximadamente 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1 o 12:1.

La relación entre PHF y PBRM puede ser aproximadamente 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

La relación entre PHF y PBRM puede ser aproximadamente 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

La relación entre PHF y PBRM puede ser aproximadamente 4:1, 3:1, o 2:1.

25 En una realización, D es a) un compuesto de auristatina; (b) un compuesto de caliqueamicina; (c) un compuesto duocarmicina; (d) un inhibidor de topoisomerasa, (e) un compuesto de pirrolobenzodiazepina; (f) un compuesto de vinca; (g) un inhibidor de la síntesis de proteínas; (h) un inhibidor de la ARN polimerasa; (i) un compuesto de unión a tubulina; o un análogo de los mismos.

30 En cierta realización, D es a) un compuesto de auristatina; (b) un compuesto de caliqueamicina; (c) un compuesto duocarmicina; (d) un compuesto de camptotecina, (e) un compuesto de pirrolobenzodiazepina; (f) un compuesto de vinca; o un análogo de los mismos.

En una realización, el compuesto de auristatina es auristatina, Dolastatina, monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF), auristatina F hidroxipropil amida (AF HPA) o auristatina F fenilendiamina (AFP).

5 En una realización, la duocarmicina o un análogo de la misma es duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA, CC-1065, adozelesina, bizelesina o carzelesina.

En una realización, el compuesto de camptotecina es camptotecina, CPT-11 (irinotecán), SN-38 o topotecán.

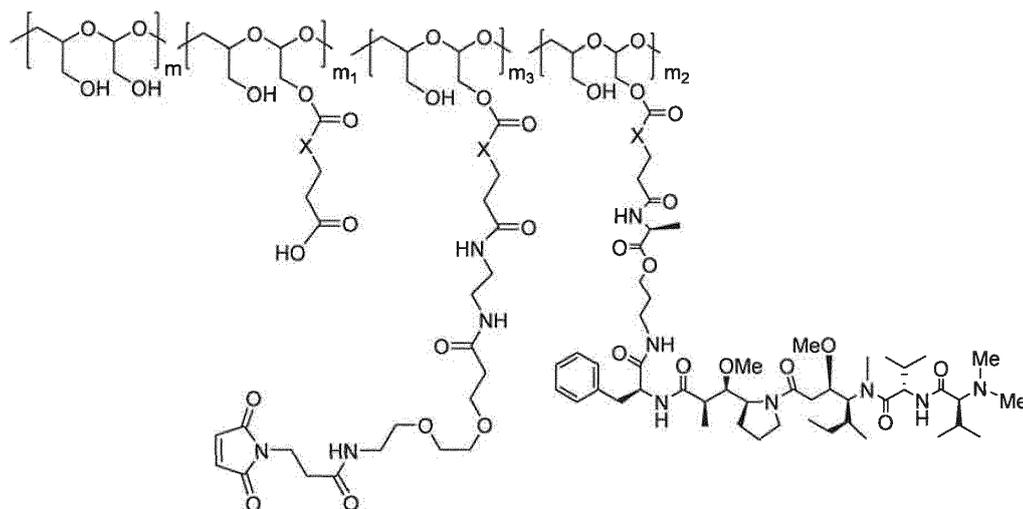
En una realización, el compuesto de pirrolobenzodiazepina es un monómero de pirrolobenzodiazepina, un dímero de pirrolobenzodiazepina simétrico o un dímero de pirrolobenzodiazepina no simétrico.

10 En una realización, D es AF HPA y la relación entre AF HPA y PBRM puede ser aproximadamente 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 25:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 o 6:1.

En otra realización, la relación entre AF HPA y PBRM puede ser aproximadamente 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 o 10:1.

15 En aún otras realizaciones, la relación entre AF HPA y PBRM puede ser aproximadamente 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1 o 12:1.

También se describe en este documento un armazón polimérico de Fórmula (Ia) útil para conjugar con una molécula de reconocimiento basada en proteínas (PBRM):



(Ia),

en donde:

20 el armazón comprende poli(1-hidroximetil-etilén hidroximetil-formal) (PHF) que tiene un peso molecular que varía desde aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa;

X es CH₂, O, o NH;

m es un entero de 1 a aproximadamente 300,

m₁ es un entero de 1 a aproximadamente 140,

25 m₂ es un entero de 1 a aproximadamente 40,

m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 18, y

la suma de m, m₁, m₂ y m₃ varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300.

El armazón de Fórmula (Ia) puede incluir una o más de las siguientes características:

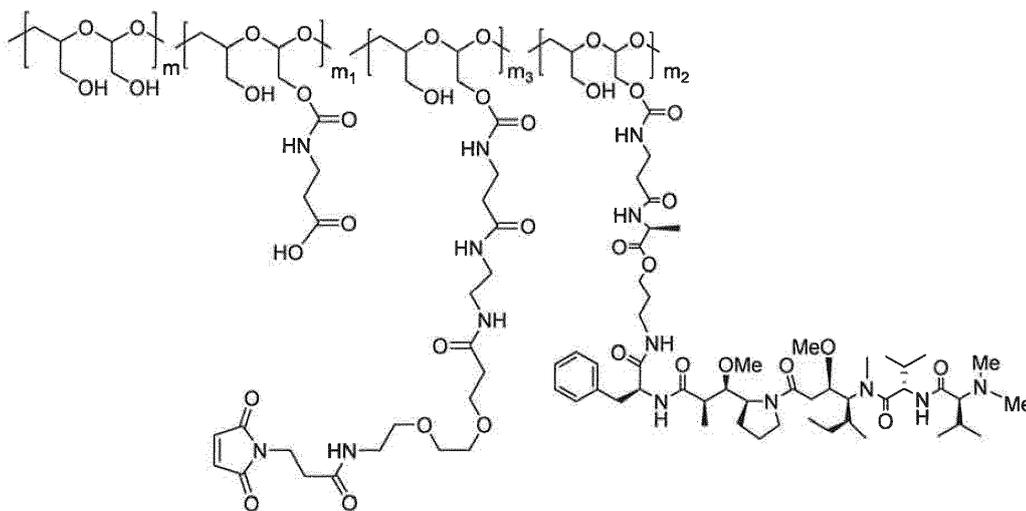
30 Cuando el PHF en la Fórmula (Ia) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa, m₂ es un entero de 1 a aproximadamente 20, m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 10, m₁ es un entero de 1 a aproximadamente 70 y la suma de m, m₁, m₂ y m₃ varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 150.

Cuando el PHF en la Fórmula (Ia) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa, m_2 es un entero de 2 a aproximadamente 15, m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 8, m_1 es un entero de 2 a aproximadamente 50 y la suma de m , m_1 , m_2 y m_3 varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 110.

- 5 Cuando el PHF en la Fórmula (Ia) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, m_2 es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 5, m_1 es un entero de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 y la suma de m , m_1 , m_2 y m_3 varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75.

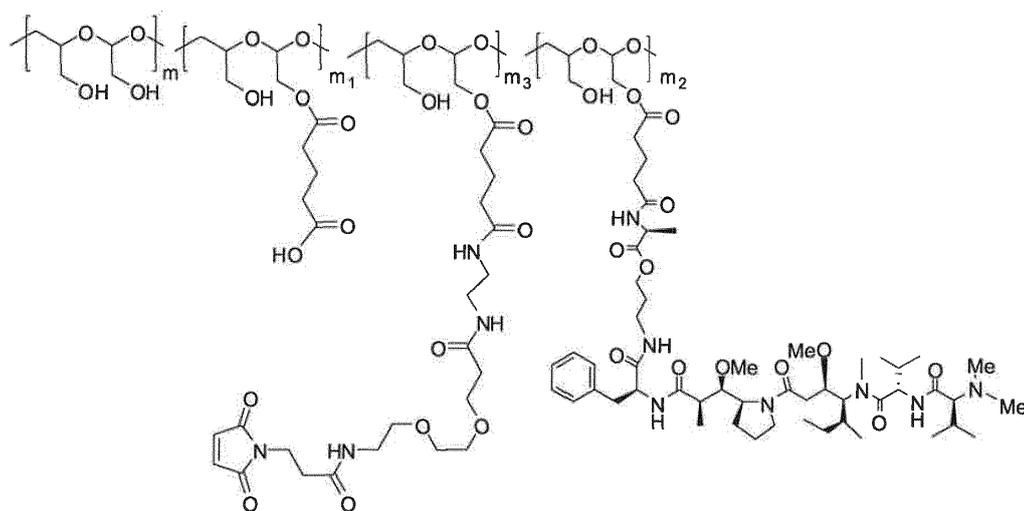
Cada presencia de la unidad estructural de maleimido en la unidad " m_3 " de Fórmula (Ia) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.

- 10 En una disposición prevista, el armazón de Fórmula (Ia) es de Fórmula (A) o (A1):



(A),

o



(A1)

en donde:

- 15 el PHF tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa;
 m es un entero de 1 a aproximadamente 75,
 m_1 es un entero de aproximadamente 5 a aproximadamente 35,
 m_2 es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 10,

m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 5, y

la suma de m , m_1 , m_2 y m_3 varía de 40 a aproximadamente 75.

Por ejemplo, cada presencia de la unidad estructural de maleimido en la unidad " m_3 " de Fórmula (A) o (A1) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.

- 5 El armazón de Fórmula (Ia) comprende además una PBRM conjugada al armazón a través de uno o más grupos maleimido del armazón polimérico. Por ejemplo, el armazón de Fórmula (Ia) comprende además una PBRM conjugada con el armazón a través de dos o más grupos maleimido (por ejemplo, hasta cinco) del armazón.

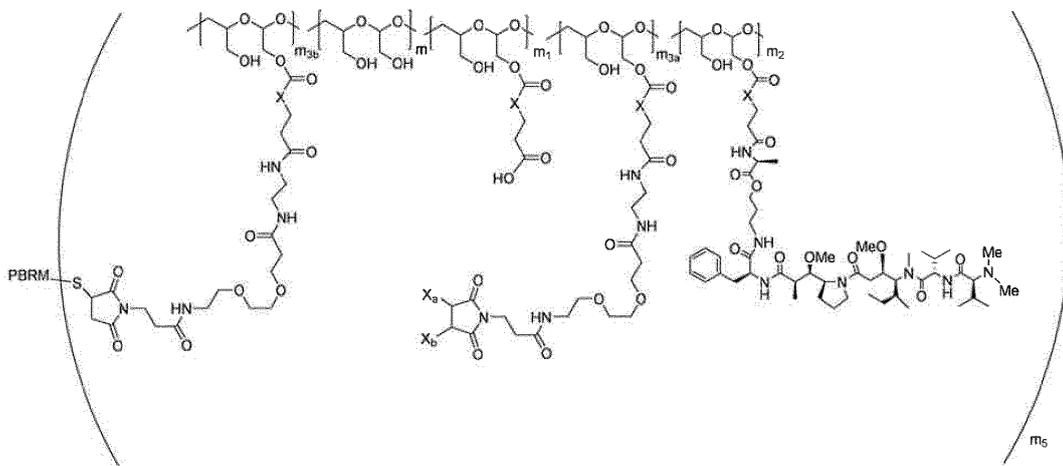
10 La PBRM tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor; 80 kDa o mayor; 100 kDa o mayor; 120 kDa o mayor; 140 kDa o mayor; 160 kDa o mayor; 180 kDa o mayor; o 200 kDa o mayor, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60-140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa, o 100-140 kDa).

15 La PBRM tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor; 80 kDa o mayor; 100 kDa o mayor; 120 kDa o mayor; 140 kDa o mayor; 160 kDa o mayor; 180 kDa o mayor; o 200 kDa o más, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60-140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa o 100-140 kDa) y tiene un grupo sulfhidrido (es decir, -SH o tiol).

20 La PBRM se conjuga con el conjugado polimérico portador del fármaco a través del grupo sulfhidrido de la PBRM conectado al grupo maleimido del conjugado polimérico portador del fármaco, véase, por ejemplo, el átomo de azufre (-S-) en la unidad " m_{3b} " del interior los paréntesis de cualquiera de las Fórmulas divulgadas en este documento, por ejemplo, Fórmula (Ib), (B), (B1) o (Ie). En ciertas disposiciones, el átomo de azufre es parte de la PBRM y se deriva de un grupo sulfhidrido (tiol) en la PBRM que se hizo reaccionar con el grupo maleimido para formar una unión (enlace de sulfuro) al conjugado polimérico que lleva el fármaco.

Una PBRM está conectada a uno o más armazones poliméricos portadores de fármacos de Fórmula (Ia).

El armazón que comprende la PBRM es de Fórmula (Ib):



(Ib),

25 en donde:

uno de X_a y X_b es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido, o X_a y X_b , junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un doble enlace carbono-carbono;

m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 17,

30 m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8, en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es m_3 (por ejemplo, un entero de 1 a aproximadamente 18),

la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300, y

m_5 es un entero de 1 a aproximadamente 10.

El armazón de Fórmula (Ib) puede incluir una o más de las siguientes características:

La PBRM tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor; 80 kDa o mayor; 100 kDa o mayor; 120 kDa o mayor; 140 kDa o mayor; 160 kDa o mayor; 180 kDa o mayor; o 200 kDa o más, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60-140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa, o 100-140 kDa).

5 La PBRM tiene un grupo sulfhidrilo (es decir, - SH o tiol).

El número total de enlaces covalentes (por ejemplo, enlace de sulfuro) formado entre el PHF y la PBRM (o el número total de puntos de unión) es 10 o menos.

10 Cuando el PHF en la Fórmula (Ib) tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 20 kDa, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 150, m_1 es un entero de 1 a aproximadamente 70, m_2 es un entero de 1 a aproximadamente 20, m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 9, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 8.

15 Cuando el PHF en la Fórmula (Ib) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 110, m_1 es un entero de 2 a aproximadamente 50, m_2 es un entero de 2 a aproximadamente 15, m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 7, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 4.

20 Cuando el PHF en la Fórmula (Ib) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75, m_1 es un entero de aproximadamente 5 a aproximadamente 35, m_2 es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 4, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 5 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 4.

En ciertas realizaciones, la relación entre auristatina F hidroxilpropil amida ("AF HPA") y PBRM puede ser de aproximadamente 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 o 6:1.

25 En algunas realizaciones, la relación entre AF HPA y PBRM puede ser aproximadamente 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 o 10:1.

En otras realizaciones, la relación entre AF HPA y PBRM puede ser aproximadamente 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1 o 12:1.

La relación entre PHF y PBRM puede ser aproximadamente 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

La relación entre PHF y PBRM puede ser aproximadamente 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

30 La relación entre PHF y PBRM puede ser aproximadamente 4:1, 3:1, o 2:1.

Las unidades estructurales bloqueadoras de maleimido (por ejemplo, X_a o X_b) son unidades estructurales que pueden unirse covalentemente a uno de los dos átomos de carbono de olefina tras la reacción del grupo maleimido con un compuesto que contiene tiol de Fórmula (II):



35 en donde:

R_{90} es NHR_{91} , OH, $COOR_{93}$, $CH(NHR_{91})COOR_{93}$ o un grupo fenilo sustituido;

R_{93} es hidrógeno o C_{1-4} alquilo;

R_{91} es hidrógeno, CH_3 o CH_3CO y

d es un entero de 1 a 3.

40 En una configuración, el compuesto bloqueador maleimido de Fórmula (II) puede ser cisteína, N-acetil cisteína, éster metílico de cisteína, N-metil cisteína, 2-mercaptoetanol, ácido 3-mercaptopropanoico, ácido 2-mercaptoacético, mercaptometanol (es decir, $HOCH_2SH$), benciltiol en el que el fenilo está sustituido con uno o más sustituyentes hidrófilos, o 3-aminopropano-1-tiol. El uno o más sustituyentes hidrófilos en fenilo comprenden OH, SH, metoxi, etoxi, COOH, CHO, CO alquilo C_1-C_4 , NH_2 , F, ciano, SO_3H o PO_3H .

45 En otra disposición, el grupo bloqueador de maleimido es $-S-(CH_2)_d-R_{90}$, en el que,

R_{90} es OH, COOH, o $CH(NHR_{91})COOR_{93}$;

R_{93} es hidrógeno o CH_3 ;

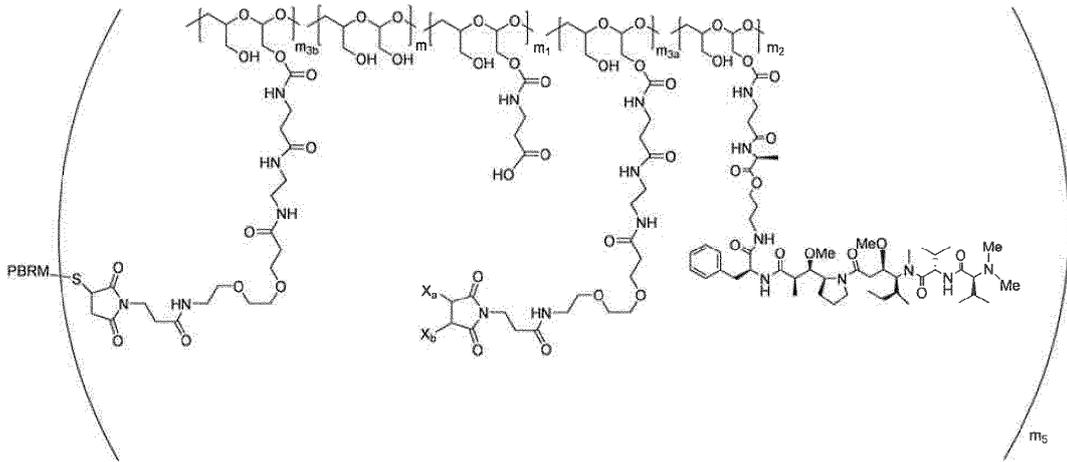
R₉₁ es hidrógeno o CH₃CO; y

d es 1 o 2.

En otra situación descrita, el grupo bloqueador de maleimido es -S-CH₂-CH(NH₂) COOH.

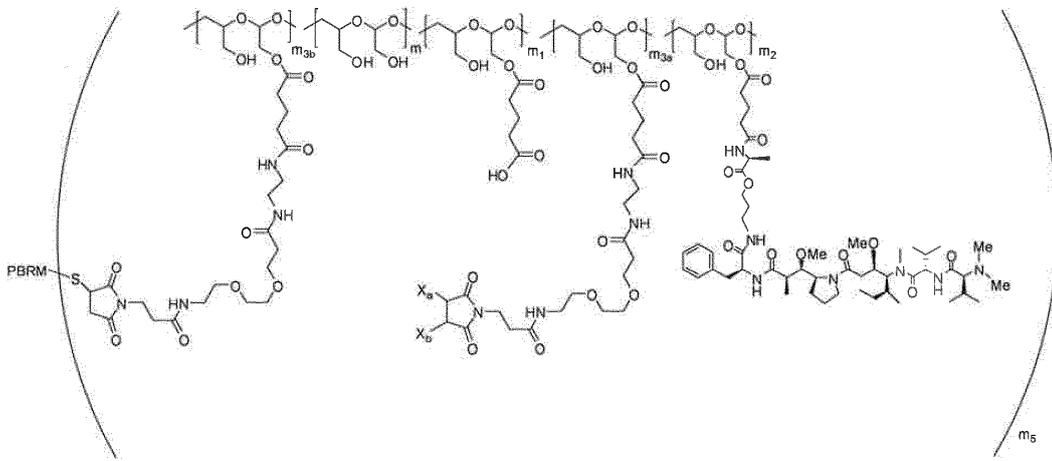
En algunas disposiciones, el grupo bloqueador de maleimido es soluble en agua.

5 El armazón de fórmula (Ib) es de fórmula (B) o (B1):



(B),

o



(B1),

en donde:

10 el PHF tiene un peso molecular que varía de 5 kDa a 10 kDa;

m es un entero de 1 a 75,

m₁ es un entero de aproximadamente 5 a aproximadamente 35,

m₂ es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 10,

m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 4,

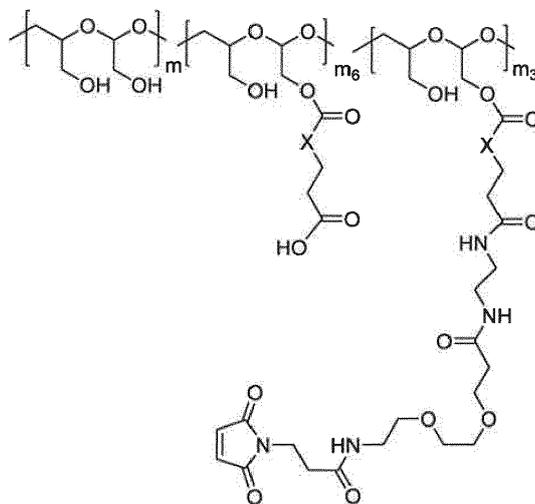
15 m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 5,

la suma de m, m₁, m₂, m_{3a}, y m_{3b} varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75, y

m₅ es un entero de 2 a aproximadamente 4.

En ciertas disposiciones, en la Fórmula (B) o (B1), el número total de puntos de conexión es 10 o menos.

La descripción aquí también proporciona armazones poliméricos de Fórmula (Ic):



(Ic),

en donde:

- 5 el armazón comprende PHF que tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa;

X es CH₂, O, o NH;

m es un entero de 1 a aproximadamente 300,

m₆ es un entero de 2 a aproximadamente 180,

- 10 m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 18, y

la suma de m, m₆, y m₃ varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300.

El armazón de Fórmula (Ic) puede incluir una o más de las siguientes características:

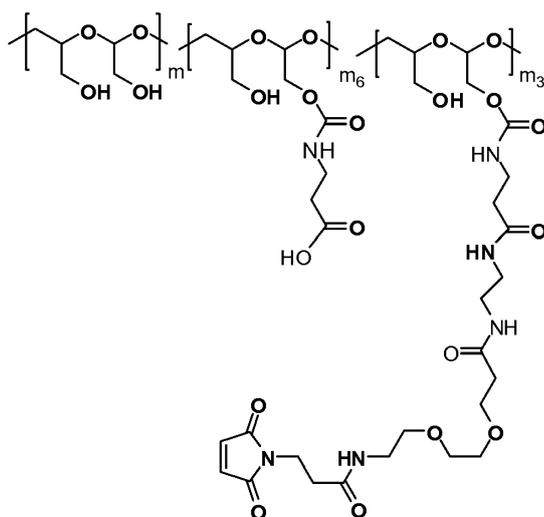
- 15 Cuando el PHF en la Fórmula (Ic) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa, la suma de m, m₆ y m₃ varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 150, m₆ es un entero de 2 a aproximadamente 90, y m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 10.

Quando el PHF en la Fórmula (Ic) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa, la suma de m, m₆, y m₃ varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 110, m₆ es un entero de aproximadamente 4 a aproximadamente 65, y m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 8.

- 20 Cuando el PHF en la Fórmula (Ic) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, la suma de m, m₆ y m₃ varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75, m₆ es un entero de aproximadamente 8 a aproximadamente 45, y m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 5.

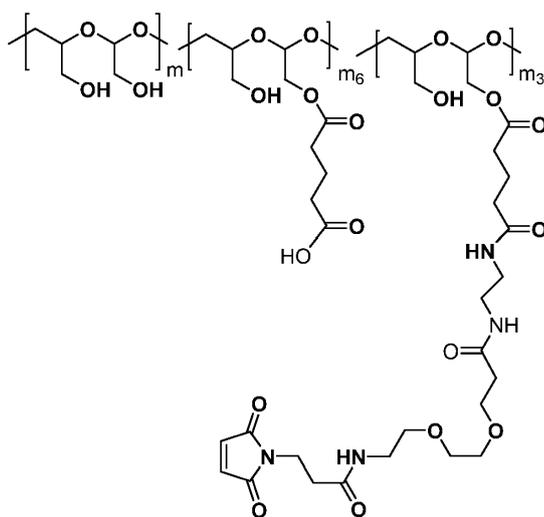
Cada presencia de la unidad estructural maleimido en la unidad "m₃" de Fórmula (Ic) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.

El armazón de fórmula (Ic) es de fórmula (C) o (C1):



(C),

o



(C1),

en donde:

- 5 el PHF tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa;
 m es un entero de 1 a aproximadamente 75,
 m₆ es un entero de aproximadamente 8 a aproximadamente 45,
 m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 5, y
 la suma de m, m₆, y m₃ varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75.
- 10 Cada presencia de la unidad estructural maleimido en la unidad "m₃" de Fórmula (C) o (C1) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.
- El armazón de Fórmula (Ic) puede comprender además una o más moléculas de fármaco ("D") conectadas al PHF.
- En una configuración, el armazón que contiene D de Fórmula (Ic) es de Fórmula (Id).
- 15 En las Fórmulas divulgadas en el presente documento, tales como Fórmula (Ia), (Ib,) (Ic), (Id), (Ie), (A), (A1), (B), (B1), (C), (C1) o (E), la desconexión o brecha entre las unidades de poliacetal indica que las unidades se pueden conectar entre sí en cualquier orden. Además, en ciertas Fórmulas (por ejemplo, las de la Tabla D) divulgadas en el presente documento, las estructuras entre corchetes, es decir, unidades de monómero de poliacetal, no están acompañadas

con el número de unidades de repetición (por ejemplo, m_1 , m_2 , m_3 , etc.) para el propósito de simplificar la ilustración y no debe interpretarse como que tiene una sola unidad de repetición cada una.

Ejemplos de PBRM incluyen anticuerpos de longitud completa tales como IgG e IgM, fragmentos de anticuerpos tales como Fabs, scFv, scFvFc, camélidos y Fab2, proteínas pequeñas y péptidos.

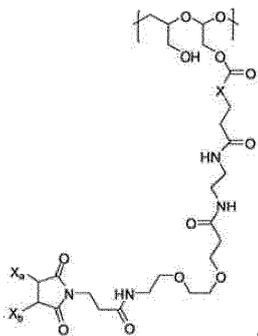
- 5 En una disposición, la PBRM es un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo scFvFc anti-5T4 humanizado. Por ejemplo, la PBRM es un ligando (LG) que comprende una inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma que se dirige a la proteína oncofetal humana 5T4.

En un aspecto de la invención, se proporciona un fármaco terapéutico y un conjugado de direccionamiento útiles en terapias antineoplásicas. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento comprenden

- 10 (a) un ligando (LG) que comprende una inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma que se dirige a la proteína oncofetal humana 5T4, el ligando (por ejemplo, que en algunas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o más) que tiene unido al mismo m_5 de armazones poliméricos de (b), en donde m_5 es de uno a aproximadamente diez; y

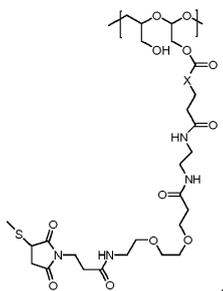
- 15 (b) un armazón polimérico que comprende poli(1-hidroximetilfenil hidroximetil-formal) (PHF) que tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 40 kDa, en donde el armazón polimérico comprende unidades m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} monoméricas dispuestas al azar, definido como sigue:

(i) m_{3a} :



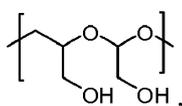
- 20 en donde m_{3a} está ausente o de 1 a 17 unidades m_{3a} monoméricas están presentes en el armazón polimérico, y en cada unidad, X_a y X_b se seleccionan independientemente de (A) uno es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido, o (B) X_a y X_b , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un doble enlace carbono-carbono;

(ii) m_{3b} :



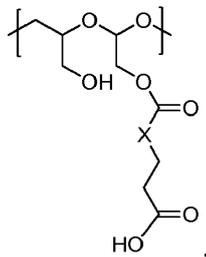
- 25 en donde el enlace de sulfuro (-S-) forma el punto de unión a LG, y en donde 1 a 8 unidades m_{3b} de monómero están presentes en el armazón polimérico, en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es 1 a 18, y en donde el átomo de azufre es parte del ligando (LG),

(iii) m :



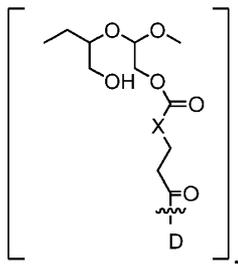
- 30 en donde de 1 a 300 unidades m monoméricas están presentes en el armazón polimérico;

(iv) m_1 :



en donde están presentes de 1 a 140 unidades m_1 monoméricas en el armazón polimérico; y

(v): m_2 :



5

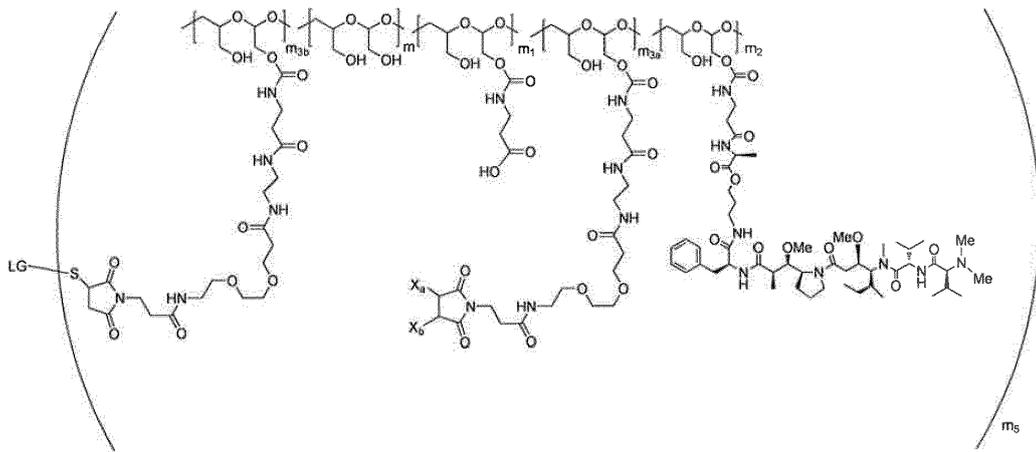
en donde están presentes de 1 a 40 unidades m_2 monoméricas en el armazón de polímero; en donde en cada una de las unidades monoméricas m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} , X es CH_2 , O o NH, y la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300, y en donde cada presencia de D es independientemente un agente terapéutico que tiene un peso molecular de ≤ 5 kDa, y la



10

entre D y el grupo carbonilo denota la unión directa o indirecta de D al grupo carbonilo.

En una disposición, el fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento tienen la siguiente estructura:



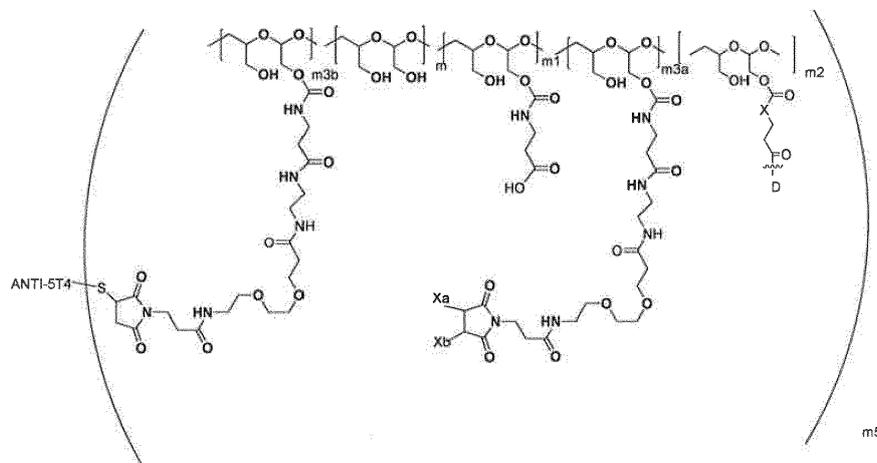
en donde:

15 el PHF tiene un peso molecular que varía de 5 kDa a 10 kDa; m es 1 a 75,

m_1 es aproximadamente 5 a aproximadamente 35, m_2 es aproximadamente 3 a aproximadamente 10, m_{3a} es 0 a aproximadamente 4, m_{3b} es 1 a aproximadamente 5, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} es aproximadamente 40 a aproximadamente 75, y m_5 es 2 a aproximadamente 4.

20 En una realización adicional, se proporciona un conjugado dirigido a fármacos anti-5T4 terapéutico útil en terapias antineoplásicas. El conjugado comprende un armazón polimérico que comprende un poli(1-hidroxi metilén hidroximetil-

formal) (PHF) que tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa, en donde el conjugado tiene la siguiente estructura:

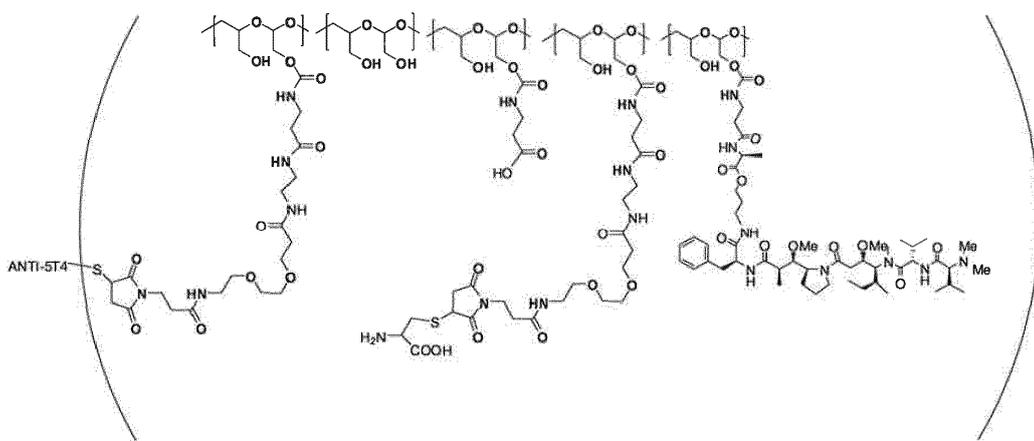


5 en donde m_5 es 1 a 10; m es un entero de 1 a 300; m_1 es un entero de 1 a 140; m_2 es un entero de 1 a 40; m_{3a} es un entero de 0 a 17; m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8; en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 18; y la suma de m , m_1 , m_2 y m_3 varía de 15 a 300; X es NH; uno de X_a o X_b es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora maleimido; y en donde cada presencia de D es independientemente un agente terapéutico que tiene un peso molecular de ≤ 5 kDa, y la



10 entre D y el grupo carbonilo denota la unión directa o indirecta de D al grupo carbonilo; en donde el ANTI-5T4 es un ligando anti-5T4 que comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma que es selectivo para el antígeno 5T4 de oncofetal humano. Por ejemplo, el peso molecular del anti-5T4 es de al menos aproximadamente 40 kDa.

15 También se prevé un fármaco terapéutico y un conjugado de direccionamiento útiles en terapias antineoplásicas que comprenden un armazón polimérico anti-5T4 y un poli(1-hidroximetil-etilen-hidroximetil-formal) (PHF) que comprende las unidades mostradas a continuación que pueden estar conectados aleatoriamente entre sí:



20 en donde:

ANTI-5T4 es un constructo de anticuerpo de cadena única que comprende la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: E; el PHF tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa; la relación promedio de armazón polimérico a anticuerpo anti-5T4 es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1 y la relación de AF HPA a anti-5T4 es de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1.

25

En algunas realizaciones, el armazón polimérico de la invención contiene unidades monoméricas dispuestas al azar m, m₁, m₂, m_{3a} y m_{3b}. En algunas realizaciones, el armazón polimérico de la invención contiene unidades monoméricas dispuestas aleatoriamente m, m₁, m₂ y m_{3b}.

5 En algunas disposiciones, el armazón polimérico de la invención contiene unidades monoméricas dispuestas al azar m, m₁, m₇, m_{3a} y m_{3b}. En algunas disposiciones, el armazón polimérico de la invención contiene unidades monoméricas dispuestas al azar m, m₁, m₇ y m_{3b}.

10 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden los conjugados, métodos para su preparación, y el uso de tales composiciones en el tratamiento de diversos trastornos neoplásicos, incluyendo el cáncer. El cáncer objetivo puede ser cáncer anal, astrocitoma, leucemia, linfoma, cabeza y cuello, hígado, testicular, de cuello uterino, sarcoma, hemangioma, esófago, ojo, laringe, boca, mesotelioma, piel, mieloma, oral, rectal, de garganta, de vejiga, de mama, útero, ovario, próstata, pulmón, colon, páncreas, renal o gástrico.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un armazón o conjugado polimérico descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En el presente documento también se prevé un método para diagnosticar un trastorno en un sujeto sospechoso de tener el trastorno. El método comprende administrar una cantidad efectiva del conjugado descrito en el presente documento al sujeto sospechoso de tener el trastorno o realizar un ensayo para detectar un antígeno/receptor objetivo en una muestra del sujeto para determinar si el sujeto expresa el antígeno o receptor objetivo.

20 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la especificación, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Las referencias citadas en este documento no se admiten como técnica anterior a la invención reivindicada. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

25 Una de las ventajas de la presente invención es que los conjugados de proteína-polímero-fármaco o los armazones poliméricos descritos en el presente documento potencian en gran medida la biodisponibilidad de los fármacos a suministrar y/o potencian la biodisponibilidad de la proteína unida al portador polimérico. Otra ventaja de la presente invención es que la eficacia de los conjugados de proteína-polímero-fármaco descritos en este documento aumenta o al menos permanece sustancialmente igual con los aumentos en la carga de fármaco de los conjugados. Otra ventaja más de la presente invención es que los conjugados de proteína-polímero a través de la conjugación con tiol a la unidad estructural de cisteína de la proteína exhiben una estabilidad sustancialmente mejorada. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras.

35 La Figura 1 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con tumores BT474 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; PBRM (trastuzumab) a 10 mg/kg; Conjugados de PBRM-polímero-fármaco descritos en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 13, a 2.5 mg/kg y 5 mg/kg.

40 La Figura 2 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con células JIMT-1 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; PBRM (trastuzumab) a 10 mg/kg; conjugados de PBRM-polímero-fármaco descritos en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, a 2.5 mg/kg.

La Figura 3 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con células HL-60 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; PBRM (lintuzumab) a 20 mg/kg; o conjugados de PBRM-polímero-fármaco descritos en el Ejemplo 8 a 20 mg/kg.

45 La Figura 4 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con células JIMT-1 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; PBRM (trastuzumab) a 20 mg/kg; Kadcyla® a 20 mg/kg; o conjugado de PBRM-polímero-fármaco descrito en el Ejemplo 14, a 2 mg/kg, 0.67 mg/kg o 0.3 mg/kg.

50 La Figura 5 muestra la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo, o conjugado de polímero-PBRM descrito en el Ejemplo 15, en 3 mg/kg, 1 mg/kg o 0.3 mg/kg.

La Figura 6 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única el día 1 del vehículo, los conjugados de PBRM-polímero-fármaco descritos en el Ejemplo 14, a 0.67 mg/kg o Ejemplo 16, a 3 mg/kg.

La Figura 7 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única el día 1 del vehículo, conjugado de PBRM-polímero-fármaco descrito en el Ejemplo 33 a 0.67 mg/kg; Ejemplo 43A a 1 mg/kg o Ejemplo 43C a 0.67 mg/kg o 3 mg/kg.

5 La Figura 8 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo, conjugado de polímero-fármaco descrito en el Ejemplo 5A a 0.22 mg/kg; o conjugados de PBRM-polímero-fármaco descritos en el Ejemplo 30B o el Ejemplo 30C cada uno a 2 mg/kg; Ejemplo 40 a 0.67 mg/kg, o Ejemplo 43B a 1 mg/kg; o Ejemplo 38 a 10 mg/kg; o Ejemplo 39 a 10 mg/kg; Cada uno administrado una vez a la semana durante 3 semanas.

10 La Figura 9 muestra la respuesta del tumor en ratones inoculados por vía subcutánea con células JIMT-1 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; Ejemplo 40 a 1 mg/kg y Ejemplo 43C a 2 mg/kg.

15 La Figura 10 muestra la PK plasmática para el AF HPA conjugado (total), AF HPA no conjugado y AF (denotado como "AF-HPA libre"), y trastuzumab en ratones inoculados por vía subcutánea con tumores BT474 después de la administración de un bolo IV de conjugado de PBRM-polímero-fármaco descrito en el Ejemplo 4, a 5 mg/kg, 3 animales/punto temporal.

La Figura 11 ilustra la afinidad y cinética de un scADC específico de 5T4 al dominio extracelular de 5T4 humano, medido por resonancia de plasmón de superficie. La afinidad de unión (K_D de <30 pM) es similar a la del scFvFc anti-5T4 no conjugado.

20 La Figura 12 ilustra la eficacia antitumoral de una scADC específica para 5T4, medida en un modelo de xenoinjerto de tumor A431. El volumen del tumor se determina en los días especificados. Los valores se expresan como Media \pm SEM. Análisis estadístico realizado por ANOVA de dos vías seguido de pruebas de Bonferroni con Graph Pad Prism (versión 5).

25 La Figura 13 ilustra la eficacia antitumoral de un scADC específico de 5T4 en ratones lampiños que portan MDA-MB-231 5T4 que sobreexpresa xenoinjerto de tumor transfectante. Los valores se expresan como Media \pm SEM. Análisis estadístico realizado por ANOVA de dos vías seguido de pruebas de Bonferroni con Graph Pad Prism (versión 5).

Descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas de la invención.

30 La presente invención proporciona nuevos conjugados de proteína-polímero-fármaco, composiciones farmacéuticas que los contienen y diversos usos de los conjugados, como se define en las reivindicaciones. También se describen aquí andamios poliméricos armazones poliméricos para hacer los conjugados, métodos sintéticos para hacer los conjugados o armazones poliméricos.

La presente divulgación también describe novedosos conjugados de polímero-fármaco, composiciones farmacéuticas que los contienen y diversos usos de los conjugados. También se describen en el presente documento métodos sintéticos para preparar los conjugados.

35 También se prevén novedosos derivados de fármacos, métodos sintéticos para elaborar los derivados, composiciones farmacéuticas que los contienen y diversos usos de los derivados de fármacos.

Definiciones/Terminología

40 Ciertos compuestos de la presente invención y definiciones de grupos funcionales específicos también se describen con más detalle en el presente documento. Para los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, edición 75, edición interna, y los grupos funcionales específicos generalmente se definen como se describen en este documento. Adicionalmente, los principios generales de la química orgánica, así como las unidades estructurales funcionales específicas y la reactividad, se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito:1999. Adicionalmente, será apreciado por un experto en la técnica. que los métodos sintéticos, como se

45 describen en el presente documento, utilizan una variedad de grupos protectores.

El uso de los artículos "un", "uno, una" y "el, la", tanto en la siguiente descripción como en las reivindicaciones, debe interpretarse de modo que cubra tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o esté claramente contradicho por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que significa" como en "que tiene una fórmula química", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, significan "que incluye pero no se limita a") a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, un armazón polimérico de una determinada fórmula incluye todas las unidades de monómero que se muestran en la fórmula y también puede incluir unidades de monómero adicionales que no se muestran en la fórmula. Además, siempre que se utilice "que comprende" o se utiliza otro término abierto en una realización, debe entenderse que la misma realización puede reivindicarse más estrechamente usando el término intermedio "que consiste esencialmente en" o el término

55 cerrado" que consiste en ".

- El término "alrededor de", "aproximadamente" o "aproximado", cuando se usa en relación con un valor numérico, significa que se incluye una colección o rango de valores. Por ejemplo, "alrededor de X" incluye un rango de valores que son $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, $\pm 0.2\%$ o $\pm 0.1\%$ de X, donde X es un valor numérico. En una realización, el término "alrededor de" se refiere a un rango de valores que son un 5% más o menos que el valor especificado. En otra realización, el término "alrededor de" se refiere a un rango de valores que son un 2% más o menos que el valor especificado. En otra realización, el término "alrededor de" se refiere a un rango de valores que son 1% más o menos que el valor especificado.
- La citación de los rangos de valores simplemente pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango, a menos que se indique otra cosa en este documento, y cada valor separado se incorpora a la especificación como si se hubiera citado individualmente en este documento. Un rango utilizado aquí, a menos que se especifique otra cosa, incluye los dos límites del rango. Por ejemplo, las expresiones "siendo x un entero entre 1 y 6" y "siendo x un entero de 1 a 6" significan que "x es 1, 2, 3, 4, 5 o 6", es decir, los términos "entre X e Y" y "rango de X a Y, incluyen X e Y y los enteros entre ellos.
- Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en este documento, pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no debe interpretarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones, a menos que se indique explícitamente otra cosa. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para lo que se reivindica.
- "Anticuerpo" se refiere a un anticuerpo de longitud completa o fragmento funcional de un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina. Por un "fragmento funcional" se entiende que se proporciona una porción suficiente de la inmunoglobulina o anticuerpo para que la unidad estructural se una efectivamente o forme complejos con la molécula de superficie celular para su población de células diana, por ejemplo, antígeno oncofetal humano.
- Como se usa en este documento, un antígeno oncofetal humano incluye, por ejemplo, proteínas asociadas a tumores tales como alfa fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, antígeno prostático específico y proteína antígeno oncofetal (también conocida como proteína inmadura receptora de laminina, y que se ha asociado con, por ejemplo, carcinomas intestinales y renales).
- Una inmunoglobulina puede ser purificada, generada de forma recombinante, generada sintéticamente, o combinaciones de las mismas, utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Mientras que las inmunoglobulinas dentro o derivadas de anticuerpos IgG son particularmente muy adecuadas para el uso en esta invención, pueden seleccionarse inmunoglobulinas de cualquiera de las clases o subclases, por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. De manera adecuada, la inmunoglobulina es de la clase IgG que incluye pero no se limita a subclases de IgG (IgG1, 2, 3 y 4) o clase IgM que es capaz de unirse específicamente a un epítopo específico en un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos camelizados de un solo dominio, anticuerpos intracelulares ("intracuerpos"), anticuerpos recombinantes, anticuerpos antiidiotípicos, anticuerpos de dominio, anticuerpos lineales, anticuerpos multiespecíficos, fragmentos de anticuerpos, tales como, Fv, Fab, F(ab)₂, F(ab)₃, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, anticuerpos de fragmento variable de cadena única (scFv), tándem/bis-scFv, Fc, pFc', scFvFc (o scFv-Fc), disulfuro Fv (dsfv), anticuerpos biespecíficos (bc-scFv) tales como anticuerpos BiTE; Anticuerpos de camélidos, anticuerpos de resurgimiento, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos de un solo dominio (sdAb, también conocidos como NANOBODY®), anticuerpos quiméricos, anticuerpos quiméricos que comprenden al menos una región constante humana, anticuerpos de doble afinidad, tales como, proteínas de direccionamiento de doble afinidad (DART™), fragmentos variables de cadena única divalentes (o bivalentes) (di-scFvs, bi-scFvs) que incluyen pero no se limitan a minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos o tricuerpos, tetracuerpos, y similares, y anticuerpos multivalentes. "Fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de la región variable de la molécula de inmunoglobulina que se une a su objetivo, es decir, la región de unión a antígeno. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere tanto al anticuerpo de longitud completa como a los fragmentos de anticuerpo, a menos que se especifique otra cosa.
- "Molécula de reconocimiento basada en proteínas" o "PBRM" se refiere a una molécula que reconoce y se une a un marcador o receptor de la superficie celular, tal como una proteína transmembrana, una proteína inmovilizada en la superficie o un protoglicano. Ejemplos de las PBRM incluyen pero no se limitan a anticuerpos (por ejemplo, Trastuzumab, Cetuximab, Rituximab, Bevacizumab, Epratuzumab, Veltuzumab, Labetuzumab, B7-H4, B7-H3, CA125, CD33, CXCR2, EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, HER2, NaPi2b, c-Met, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PD-L1, c-Kit, MUC1 y anti-5T4) o péptidos (péptidos de direccionamiento al receptor de LHRH, péptido EC-1), lipocalinas, tales como, por ejemplo, anticualinas, proteínas tales como, por ejemplo, interferones, linfoquinas, factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, y similares, péptidos o miméticos de péptidos y similares. La molécula de reconocimiento basada en proteínas, además de dirigir el conjugado polimérico modificado a una célula, tejido o ubicación específicos, también puede tener cierto efecto terapéutico, tal como la actividad antiproliferativa (citostática y/o citotóxica) contra una célula o ruta diana. La molécula de reconocimiento basada en proteínas comprende o puede diseñarse para comprender al menos un grupo químicamente reactivo tal como, -COOH,

amina primaria, amina secundaria -NHR, -SH, o una unidad estructural de aminoácidos químicamente reactivo o cadenas laterales tales como, por ejemplo, tirosina, histidina, cisteína o lisina. La PBRM es un ligando (LG) o una unidad estructural direccionada que se une específicamente o forma complejos con una molécula de superficie celular, tal como un receptor de superficie celular o un antígeno, para una población de células diana determinada, siendo la diana la proteína oncofetal humana 5T4. Tras la unión específica o la formación de complejos del ligando con su receptor, la célula es permisiva para la captación del ligando o conjugado de ligando-fármaco, que luego se internaliza en la célula. Como se usa en este documento, un ligando que "se une específicamente o forma complejos" o "se dirige" a una molécula de superficie celular se asocia preferentemente con una molécula de superficie celular a través de fuerzas intermoleculares. Por ejemplo, el ligando puede asociarse preferentemente con la molécula de superficie celular con una K_d de menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 5 nM o menos de 500 pM. Las técnicas para medir la afinidad de unión de un ligando a una molécula de superficie celular son bien conocidas; por ejemplo, una técnica adecuada, se denomina resonancia de plasmón de superficie (SPR). En una realización, el ligando se usa para direccionar y no tiene un efecto terapéutico detectable como separado del fármaco que suministra. En otra realización, el ligando funciona tanto como una unidad estructural direccionada y como un agente terapéutico o inmunomodulador (por ejemplo, para mejorar la actividad del fármaco activo o profármaco).

"Biocompatible", como se usa en el presente documento, pretende describir compuestos que ejercen un mínimo de efectos destructivos o de respuesta del huésped mientras están en contacto con fluidos corporales o células o tejidos vivos. Por lo tanto, un grupo biocompatible, como se usa en este documento, se refiere a una unidad estructural alifática, cicloalquilo, heteroalifática, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, que se encuentra dentro de la definición del término biocompatible, como se define anteriormente y en el presente documento. El término "biocompatibilidad", como se usa en el presente documento, también significa que los compuestos exhiben interacciones mínimas con proteínas de reconocimiento, por ejemplo, anticuerpos de origen natural, proteínas celulares, células y otros componentes de sistemas biológicos, a menos que tales interacciones sean específicamente deseables. Por lo tanto, las sustancias y los grupos funcionales destinados específicamente a causar las interacciones mínimas anteriores, por ejemplo, fármacos y profármacos, se consideran biocompatibles. Preferiblemente (con la excepción de los compuestos destinados a ser citotóxicos, tales como, por ejemplo, agentes antineoplásicos), los compuestos son "biocompatibles" si su adición a células normales *in vitro*, en concentraciones similares a las concentraciones sistémicas *in vivo* deseadas, da como resultado menos de o igual a 1% de muerte celular durante el tiempo equivalente a la vida media del compuesto *in vivo* (por ejemplo, el período de tiempo requerido para que el 50% del compuesto administrado *in vivo* se elimine/evacúe), y su administración *in vivo* induce inflamación mínima y médicamente aceptable, reacción a cuerpo extraño, inmunotoxicidad, toxicidad química y/u otros efectos adversos similares. En la oración anterior, el término "células normales" se refiere a las células que no están destinadas a ser destruidas o de alguna otra manera afectadas significativamente por el compuesto que se está probando.

"Biodegradable": como se usa en este documento, los polímeros "biodegradables" son polímeros que son susceptibles de procesamiento biológico *in vivo*. Tal como se usa en el presente documento, los compuestos o unidades estructurales "biodegradables" son aquellos que, cuando son absorbidos por las células, pueden descomponerse mediante la maquinaria lisosomal u otra química o por hidrólisis en componentes que las células pueden reutilizar o eliminar sin un efecto tóxico significativo sobre las celdas. El término "bioescindible" como se usa en este documento tiene el mismo significado de "biodegradable". Los fragmentos de degradación inducen preferiblemente poca o ninguna sobrecarga de órganos o células o procesos patológicos causados por TAL sobrecarga u otros efectos adversos *in vivo*. Ejemplos de procesos de biodegradación incluyen hidrólisis, oxidación y reducción enzimática y no enzimática. Las condiciones adecuadas para la hidrólisis no enzimática de los conjugados de proteína-polímero-fármaco biodegradables (o sus componentes, por ejemplo, el portador polimérico biodegradable y los enlazadores entre el vehículo y el anticuerpo o la molécula del fármaco) descritos aquí, por ejemplo, incluyen la exposición de los conjugados biodegradables al agua a una temperatura y un pH del compartimento intracelular lisosomal. La biodegradación de algunos conjugados de proteína-polímero-fármaco (o sus componentes, por ejemplo, el portador polimérico biodegradable y los enlazadores entre el vehículo y el anticuerpo o la molécula del fármaco), también se puede mejorar de forma extracelular, por ejemplo, en regiones de pH bajo del cuerpo animal, por ejemplo, un área inflamada, en la proximidad de macrófagos activados u otras células que liberan factores facilitadores de la degradación. En ciertas realizaciones preferidas, el tamaño efectivo del portador de polímero a pH ~7.5 no cambia de manera detectable durante 1 a 7 días, y permanece dentro del 50% del tamaño del polímero original durante al menos varias semanas. Por otro lado, con un pH de 5, el portador de polímero preferiblemente se degrada de manera detectable durante 1 a 5 días, y se transforma completamente en fragmentos de bajo peso molecular dentro de un marco de tiempo de dos semanas a varios meses. La integridad del polímero en tales pruebas se puede medir, por ejemplo, por HPLC de exclusión de tamaño. Aunque en algunos casos es preferible una degradación más rápida, en general puede ser más deseable que el polímero se degrade en las células con una tasa que no exceda la tasa de metabolización o excreción de los fragmentos de polímero por las células. En realizaciones preferidas, los polímeros y los subproductos de biodegradación de polímeros son biocompatibles.

"Biodisponibilidad": el término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de fármaco o compuesto administrado a un sujeto. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (tasa) como la cantidad total (extensión) del fármaco o compuesto que alcanza la circulación general desde una forma de dosificación administrada.

"Compuesto bloqueador de maleimida": como se usa en este documento se refiere a un compuesto que puede reaccionar con maleimida para convertirlo en succinimida y "unidad estructural bloqueadora de maleimida" se refiere a la unidad estructural química unida a la succinimida después de la conversión. En ciertas realizaciones, el compuesto bloqueador de maleimida es un compuesto que tiene un grupo tiol terminal para reaccionar con la maleimida. En ciertas realizaciones, el compuesto bloqueador de maleimida es soluble en agua, de tal manera que la reacción con maleimida puede tener lugar en una solución acuosa. Por ejemplo, la unidad estructural bloqueadora de maleimida resultante es soluble en agua o hidrófilo. En una realización, el compuesto bloqueador de maleimida es cisteína, N-acetil cisteína, cisteína metil éster, N-metil cisteína, 2-mercaptoetanol, ácido 3-mercaptopropanoico, ácido 2-mercaptoacético, mercaptometanol (es decir, HOCH₂SH), bencilo tiol en el que fenilo está sustituido con uno o más sustituyentes hidrófilos, o 3-aminopropano-1-tiol.

"Hidrófilo": el término "hidrófilo" en lo que se refiere a los sustituyentes, por ejemplo, en las unidades monoméricas poliméricas o en una unidad estructural bloqueadora de maleimida para hacerlos hidrófilos o solubles en agua, no difiere esencialmente del significado común de este término en la técnica. y denota unidades estructurales químicas que contienen átomos ionizables, polares o polarizables, o que de otra manera pueden ser solvatados por moléculas de agua. Por lo tanto, un grupo hidrófilo, como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad estructural alifática, cicloalquilo, heteroalifática, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, que se encuentra dentro de la definición del término hidrófilo, como se define anteriormente. Ejemplos de unidades estructurales orgánicas hidrófilas particulares que son adecuados incluyen, sin limitación, grupos alifáticos o heteroalifáticos que comprenden una cadena de átomos en un rango de entre aproximadamente uno y doce átomos, hidroxilo, hidroxialquilo, amina, carboxilo, amida, éster carboxílico, tioéster, aldehído, nitrilo, isonitrilo, nitroso, hidroxilamina, mercaptoalquilo, heterociclo, carbamatos, ácidos carboxílicos y sus sales, ácidos sulfónicos y sus sales, ésteres de ácido sulfónico, ácidos fosfóricos y sus sales, ésteres de fosfato, éteres de poliglicol, poliaminas, policarboxilatos, poliésteres y politioésteres. Los sustituyentes hidrófilos pueden comprender un grupo carboxilo (COOH), un grupo aldehído (CHO), un grupo cetona (alquilo C₁₋₄), un metilol (CH₂OH) o un glicol (por ejemplo, CHOH-CH₂OH o CH-(CH₂OH)₂), NH₂, F, ciano, SO₃H o PO₃H, y similares.

El término "hidrófilo" en lo que se refiere a los polímeros de la invención generalmente no difiere del uso de este término en la técnica, e indica polímeros que comprenden grupos funcionales hidrófilos como se definió anteriormente. En algunas disposiciones, el polímero hidrófilo es un polímero soluble en agua. La hidrofiliidad del polímero se puede medir directamente a través de la determinación de la energía de hidratación, o se puede determinar a través de la investigación entre dos fases líquidas, o mediante cromatografía en fases sólidas con hidrofobicidad conocida, tal como, por ejemplo, C4 o C18.

"Portador polimérico": el término portador polimérico, como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero o un polímero modificado, que es adecuado para unirse covalentemente o puede estar unido covalentemente a una o más moléculas de fármaco con un enlazador designado y/o una o más PBRMs con un enlazador designado.

"Condiciones fisiológicas": la expresión "condiciones fisiológicas", como se usa en el presente documento, se relaciona con el rango de condiciones químicas (por ejemplo, pH, concentración iónica) y bioquímicas (por ejemplo, concentraciones de enzimas) que probablemente se encuentren en los fluidos extracelulares de los tejidos vivos. Para la mayoría de los tejidos normales, el pH fisiológico varía de aproximadamente 7.0 a 7.4. El plasma sanguíneo circulante y el líquido intersticial normal representan ejemplos típicos de condiciones fisiológicas normales.

"Polisacárido", "carbohidrato" u "oligosacárido": los términos "polisacárido", "carbohidrato" u "oligosacárido" son conocidos en la técnica y se refieren, en general, a sustancias que tienen la fórmula química (CH₂O)_n, donde generalmente n>2, y sus derivados. Los carbohidratos son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas, o cambian a tales sustancias en simples transformaciones químicas, tal como hidrólisis, oxidación o reducción. Típicamente, los carbohidratos están presentes en forma de acetales o cetales cíclicos (tal como glucosa o fructosa). Estas unidades cíclicas (monosacáridos) se pueden conectar entre sí para formar moléculas con pocas (oligosacáridos) o varias (polisacáridos) unidades de monosacáridos. A menudo, los carbohidratos con números, tipos y posiciones bien definidos de unidades de monosacáridos se denominan oligosacáridos, mientras que los carbohidratos que consisten en mezclas de moléculas de números variables y/o la posición de unidades de monosacáridos se denominan polisacáridos. Los términos "polisacárido", "carbohidrato" y "oligosacárido", se usan aquí de manera intercambiable. Un polisacárido puede incluir azúcares naturales (por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, ribosa y xilosa) y/o derivados de azúcares de origen natural (por ejemplo, 2'-fluororibosa, 2'-desoxirribosa y hexosa).

"Fármaco": como se usa en el presente documento, el término "fármaco" se refiere a un compuesto que es biológicamente activo y proporciona un efecto fisiológico deseado después de la administración a un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un ingrediente farmacéutico activo).

"Profármaco": como se usa en el presente documento, el término "profármaco" se refiere a un precursor de un fármaco activo, es decir, un compuesto que puede transformarse en un fármaco activo. Típicamente, un profármaco de este tipo está sujeto a procesamiento in vivo, lo que convierte el fármaco en una forma fisiológicamente activa. En algunos casos, un profármaco puede tener un efecto fisiológico deseado. Un efecto fisiológico deseado puede ser, por ejemplo, terapéutico, citotóxico, inmunomodulador, o similares.

"Citotóxico": como se usa en el presente documento, el término "citotóxico" significa tóxico para las células o una población de células seleccionadas (por ejemplo, células cancerosas). El efecto tóxico puede provocar la muerte celular y/o la lisis. En ciertos casos, el efecto tóxico puede ser un efecto destructivo subletal en la célula, por ejemplo, frenando o deteniendo el crecimiento celular. Para lograr un efecto citotóxico, el fármaco o profármaco puede seleccionarse de un grupo que consiste en un agente dañino del ADN, un agente que rompe los microtúbulos o una proteína o polipéptido citotóxico, entre otros.

"Citostático": como se usa en el presente documento, el término "citostático" se refiere a un fármaco u otro compuesto que inhibe o detiene el crecimiento y/o multiplicación celular.

"Molécula pequeña": como se usa en este documento, el término "molécula pequeña" se refiere a las moléculas, ya sean de origen natural o creadas artificialmente (por ejemplo, a través de síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo. Las moléculas pequeñas preferidas son biológicamente activas porque producen un efecto local o sistémico en animales, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos. En la invención, la molécula pequeña es un fármaco y la molécula pequeña se denomina "molécula de fármaco" o "fármaco" o "agente terapéutico". La molécula de fármaco tiene un MW menor o igual a aproximadamente 5 kDa. En otras realizaciones, la molécula de fármaco tiene un MW inferior o igual a aproximadamente 1.5 kDa. En realizaciones, la molécula de fármaco se selecciona de alcaloides vinca, auristatinas, duocarmicinas, inhibidores de la quinasa, inhibidores de la MEK, inhibidores de la KSP, inhibidores de la PI3 quinasa, caliqueamicinas, SN38, camptotecina, inhibidores de la topoisomerasa, camptotecinas no naturales, inhibidores de la síntesis de proteínas, Inhibidor de la ARN polimerasa, pirrolobenzodiazepinas, maitansinoides, fármacos de unión al ADN, fármacos de intercalación de ADN y análogos de los mismos. Preferiblemente, aunque no necesariamente, el fármaco es uno que ya se ha considerado seguro y efectivo para ser usado por una agencia u organismo gubernamental apropiado, por ejemplo, la FDA. Por ejemplo, los fármacos para uso humano listados por la FDA en virtud de 21 C.F.R. §§ 330.5, 331 a 361, y 440 a 460; fármacos para uso veterinario listados por la FDA en virtud de 21 C.F.R. §§ 500 a 589 se consideran todas adecuadas para usar con los presentes polímeros hidrofílicos. Las clases de moléculas de fármaco que se pueden usar en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sustancias anticancerígenas, radionúclidos, vitaminas, sustancias anti-SIDA, antibióticos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores de enzimas, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistaminas, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias antiParkinson, antiespasmódicos y contrayentes musculares, incluidos bloqueadores de canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, antiparasitarios y/o compuestos antiprotozoarios, moduladores de las interacciones de la matriz extracelular de la célula, que incluyen inhibidores del crecimiento celular y moléculas antiadherentes, agentes vasodilatadores, inhibidores de la síntesis de ADN, ARN o proteínas, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores antiangiogénicos, factores antiseoretos, agentes anticoagulantes y/o antitrombóticos, anestésicos locales, oftalmológicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antisicóticas, antieméticos, agentes formadores de imagen. Muchas moléculas grandes también son fármacos y tales moléculas grandes pueden usarse en los conjugados y otros constructos descritos en este documento. Ejemplos de moléculas grandes adecuadas incluyen, por ejemplo, moléculas basadas en aminoácidos. Las moléculas basadas en aminoácidos pueden abarcar, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, enzimas, anticuerpos, inmunoglobulinas o fragmentos funcionales de los mismos, entre otros.

Se puede encontrar una lista más completa, aunque no exhaustiva, de clases y fármacos específicos adecuados para uso en la presente invención en "Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications" by Axel Kleemann and Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999 y en la "Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", Editado por Susan Budavari et al., CRC Press, 1996. En realizaciones preferidas, el fármaco utilizado en esta invención es un agente terapéutico que tiene actividad antiproliferativas (citostáticas y/o citotóxicas) contra una célula o ruta diana. El fármaco puede tener un grupo químicamente reactivo tal como, por ejemplo, -COOH, amina primaria, amina secundaria -NHR, -OH, -SH, -C(O)H, -C(O)R, -C(O)NHR^{2b}, C(S)OH, -S(O)₂OR^{2b}, -P(O)₂OR^{2b}, -CN, -NC o -ONO, en donde R es una unidad estructural alifática, heteroalifática, carbocíclico o heterocicloalquilo y R^{2b} es un hidrógeno, una unidad estructural alifática, heteroalifática, carbocíclico o heterocíclico.

"Derivado de fármaco" o "fármaco modificado" o similar, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende la molécula de fármaco que se pretende administrar por el conjugado de la invención y un grupo funcional capaz de unir la molécula de fármaco al portador polimérico.

"Forma activa", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma de un compuesto que muestra la eficacia farmacéutica prevista in vivo o in vitro. En particular, cuando una molécula de fármaco destinada a ser suministrada por el conjugado de la invención se libera del conjugado, la forma activa puede ser el propio fármaco o sus derivados, que exhiben las propiedades terapéuticas pretendidas. La liberación del fármaco del conjugado se puede lograr mediante la escisión de una unión biodegradable del enlazador que une el fármaco al portador polimérico. Los derivados del fármaco activo en consecuencia pueden comprender una porción del enlazador.

"Etiqueta de diagnóstico": como se usa en este documento, el término etiqueta de diagnóstico se refiere a un átomo, grupo de átomos, unidad estructural o grupo funcional, un nanocrystal u otro elemento discreto de una composición de materia, que puede detectarse in vivo o ex vivo usando métodos analíticos conocidos en la técnica. Cuando se asocian con un conjugado de la presente invención, tales etiquetas de diagnóstico permiten la monitorización del conjugado in vivo. Alternativamente o adicionalmente, se pueden usar constructos y composiciones que incluyen etiquetas de

5 diagnóstico para monitorizar funciones o estructuras biológicas. Ejemplos de etiquetas de diagnóstico incluyen, sin limitación, etiquetas que se pueden usar en procedimientos de diagnóstico médico, tal como isótopos radiactivos (radionúclidos) para escintigrafía gamma y Tomografía por Emisión de Positrones (PET), agentes de contraste para Imágenes de Resonancia Magnética (IRM) (por ejemplo, átomos paramagnéticos y nanocristales superparamagnéticos), agentes de contraste para tomografía computarizada y otros métodos de generación de imágenes basados en rayos X, agentes para métodos de diagnóstico basados en ultrasonido (sonografía), agentes para la activación de neutrones (por ejemplo, boro, gadolinio), fluoróforos para diversos procedimientos ópticos y, en general, unidades estructurales que pueden emitir, reflejar, absorber, dispersar o afectar los campos electromagnéticos u ondas (por ejemplo, rayos gamma, rayos X, ondas de radio, microondas, luz), partículas (por ejemplo, partículas alfa, electrones, positrones, neutrones, protones) u otras formas de radiación, por ejemplo, ultrasonido.

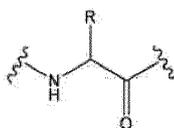
Los siguientes son términos más generales utilizados a lo largo de la presente solicitud:

15 "Animal": el término animal, como se usa en el presente documento, se refiere a los humanos, así como a los animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, gusanos y células individuales. Los cultivos celulares y las muestras de tejido vivo se consideran pluralidades de animales. Preferiblemente, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, un primate o un cerdo). Un animal puede ser un animal transgénico o un clon humano. El término "sujeto" abarca a los animales.

20 "Cantidad eficiente": en general, como se refiere a un agente activo o dispositivo de suministro de fármacos, el término "cantidad eficiente" se refiere a la cantidad necesaria para obtener la respuesta biológica deseada. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad eficiente de un agente o dispositivo puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente que se va a suministrar, la composición de la matriz de encapsulación, el tejido diana, etc. Por ejemplo, la cantidad eficiente de micropartículas que contienen un antígeno que se suministrará para inmunizar a un individuo es la cantidad que da como resultado una respuesta inmune suficiente para prevenir la infección con un organismo que tiene el antígeno administrado.

30 "Aminoácido natural", como se usa en el presente documento, se refiere a uno cualquiera de los L-aminoácidos comunes de origen natural que se encuentran en proteínas de origen natural: glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), cisteína (Cys) y metionina (Met).

"Aminoácido no natural", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier aminoácido que no sea un aminoácido natural. Esto incluye, por ejemplo, los aminoácidos que comprenden residuos α -, β -, ω -, D-, L-amino acilo. Más generalmente, el aminoácido no natural comprende un residuo de la fórmula general



35 en donde la cadena lateral R es distinta de las cadenas laterales de aminoácidos que ocurren en la naturaleza. Los aminoácidos no naturales de ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, sarcosina (N-metilglicina), citrulina (cit), homocitrullina, β -ureidoalanina, tiocitrulina, hidroxiprolina, alotreonina, ácido pipercolico (homoprolina), ácido α -aminoisobutírico, tert-butilglicina, tert-butilalanina, α -isoleucina, norleucina, α -metil-leucina, ciclohexilglicina, β -ciclohexilalanina, β -ciclopentilalanina, α -metilprolina, fenilglicina, α -metilfenilalanina y homofenilalanina.

40 "Amino acilo": más generalmente, el término amino acilo, como se usa en este documento, abarca aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales.

45 "Poliamida": se refiere a homopolímeros o heteropolímeros de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. Homopolímeros ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, poli-lisina, poli-arginina, ácido poli- γ -glutámico, y similares. Los heteropolímeros ilustrativos incluyen polímeros que comprenden fragmentos de péptidos seleccionados de peptidasas, lisozimas, metaloproteinasas, y similares.

"PHF" se refiere a poli(1-hidroximetileno hidroximetil-formal).

Como se usa en el presente documento, los términos "unidad polimérica", "unidad monomérica", "monómero", "unidad monomérica", "unidad" se refieren a una unidad estructural repetible en un polímero.

50 Como se usa en el presente documento, "peso molecular" o "MW" de un polímero o portador polimérico/armazón o conjugados de polímero se refiere al peso molecular promedio en peso, a menos que se especifique otra cosa.

La presente invención pretende incluir todos los isótopos de los átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. A

modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

5 La presente invención pretende incluir todos los isómeros del compuesto, que se refiere a e incluye isómeros ópticos e isómeros tautoméricos, donde los isómeros ópticos incluyen enantiómeros y diastereómeros, isómeros quirales e isómeros no quirales, y los isómeros ópticos incluyen isómeros ópticos aislados así como mezclas de isómeros ópticos que incluyen mezclas racémicas y no racémicas; donde un isómero puede estar en forma aislada o en una mezcla con uno o más isómeros.

Portadores poliméricos

10 En ciertas realizaciones de ejemplo, los conjugados de la invención encuentran uso en aplicaciones biomédicas, tales como el suministro de fármacos y la ingeniería de tejidos, y el portador es biocompatible y biodegradable. En ciertas realizaciones, el portador es un polímero soluble, nanopartícula, gel, liposoma, micela, sutura, implante, etc. En ciertas realizaciones, el término "polímero soluble" abarca un polímero biocompatible biodegradable tal como un polial (por ejemplo, poliactal o policetal hidrófilo). En ciertas otras realizaciones, el portador es un polímero totalmente sintético, semisintético o de origen natural. En ciertas otras realizaciones, el portador es hidrófilo.

15 En ciertas realizaciones de ejemplo, los portadores usados en la presente invención son poliales biocompatibles biodegradables que comprenden al menos un enlace hidrolizable en cada unidad monomérica situada dentro de la cadena principal. Esto asegura que el proceso de degradación (a través de la hidrólisis/escisión de las unidades monoméricas) dará como resultado la fragmentación del conjugado polimérico a los componentes monoméricos (es decir, degradación), y confiere a los conjugados poliméricos de la invención sus propiedades biodegradables. Las propiedades (por ejemplo, solubilidad, bioadhesividad e hidrofiliidad) de los conjugados de polímeros biocompatibles biodegradables pueden modificarse mediante la sustitución subsiguiente de grupos hidrofílicos o hidrófobos adicionales. Ejemplos de polímeros biocompatibles biodegradables adecuados para poner en práctica la invención se pueden encontrar, entre otros, en las patentes U.S. Nos. 5,811,510; 5,863,990; 5,958,398; 7,838,619 y 7,790,150; y la publicación U.S. No. 2006/0058512. En los documentos citados anteriormente se puede encontrar orientación sobre el significado, la preparación y las aplicaciones de este tipo de polímeros. En ciertas realizaciones, se anticipa que la presente invención será particularmente útil en combinación con los documentos de patente mencionados anteriormente, así como las patentes U.S. No. 5,582,172 y 6,822,086.

20 Los conjugados de esta invención son hidrófilos, hidrolizables y comprenden moléculas de fármacos (por ejemplo, alcaloides vinca o derivados, inhibidores de la topoisomerasa, tales como, por ejemplo, SN38, camptotecina, topotecán, exatecan, compuestos o derivados de camptotecina no naturales; auristatinas, dolastatinas, nemorubicina y sus derivados, PNU-159682, antraciclina, duocarmicinas, inhibidores de la quinasa (por ejemplo, inhibidores de la PI3 quinasa o inhibidores de la MEK), inhibidores de la KSP, caliqueamicinas, pirolobenzodiazepinas, maitansinoides, elinafida, fármacos de unión al ADN, fármacos de intercalación de ADN, y estereoisómeros, isómeros, análogos y derivados de los mismos) y anticuerpos (por ejemplo, Trastuzumab, Cetuximab, Rituximab, Bevacizumab, Epratuzumab, Veltuzumab, Labetuzumab, B7-H4, B7-H3, CA125, CD33, CXCR2, EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, HER2, NaPi2b, c-Met, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PD-L1, NaPi2b, c-Kit, MUC1, y anti-5T4) o péptidos (péptidos de direccionamiento al receptor de LHRH, péptido EC-1) unidos covalentemente al portador de polímero a través de enlaces que contienen uno o más enlaces biodegradables. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de ejemplo, los portadores adecuados para poner en práctica la presente invención son poliales que tienen al menos un átomo de oxígeno acetal/cetal en cada unidad monomérica posicionada dentro de la cadena principal. Como se discutió anteriormente, esto asegura que el proceso de degradación (a través de la hidrólisis/escisión de los grupos acetal/cetal del polímero) dará como resultado la fragmentación del conjugado polial a componentes de bajo peso molecular (es decir, degradación). En ciertas disposiciones, los portadores poliméricos biocompatibles biodegradables usados para la preparación de conjugados poliméricos de la invención, son polisacáridos, glicopolisacáridos de origen natural, y polímeros sintéticos de origen poliglicósido, poliactal, poliamida, poliéter y poliéster y productos de su oxidación, ficcionalización, modificación, entrecruzamiento y conjugación.

25 En ciertas disposiciones, el portador es un polímero biodegradable hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en carbohidratos, glicopolisacáridos, glicolípidos, glicoconjugados, poliactales, policetales y derivados de los mismos.

30 En ciertas disposiciones de ejemplo el portador es un homopolisacárido biocompatible biodegradable lineal o ramificado de origen natural seleccionado del grupo que consiste en celulosa, amilosa, dextrano, levan, fucoidan, carraginan, inulina, pectina, amilopectina, glucógeno y lichenan.

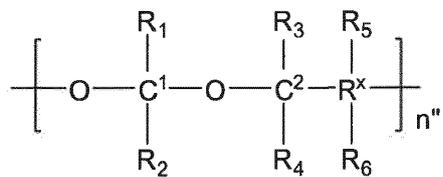
En ciertas otras disposiciones de ejemplo, el portador es un heteropolisacárido biocompatible biodegradable, lineal y ramificado, de origen natural, seleccionado del grupo que consiste en agarosa, hilonano, condroitinsulfato, dermatansulfato, queratansulfato, ácido alginico y heparina.

35 En aún otras disposiciones de ejemplo, el vehículo polimérico comprende un copolímero de un poliactal/poliquetal y un polímero hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en poliactilatos, polímeros de polivinilo, poliésteres, poliortoésteres, poliamidas, polipéptidos y derivados de los mismos.

En aún otras disposiciones, el portador polimérico es dextrina que se produce mediante la hidrólisis de un almidón obtenido a partir de diversos productos naturales tales como, por ejemplo, trigo, arroz, maíz y tapioca. Dependiendo de la estructura del material de partida del almidón, cada dextrina comprende una distribución única de enlaces α -1,4 y enlaces α -1,6. Dado que la tasa de biodegradabilidad de los enlaces α -1,6 es típicamente menor que la de los enlaces α -1,4, preferiblemente el porcentaje de enlaces α -1,6 es menor que 10% y más preferiblemente menor que 5%. En una disposición, el peso molecular de la dextrina está en el rango de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa, más preferiblemente de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa, o de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa o de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa.

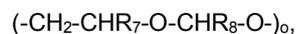
- 5
- 10 En ciertas disposiciones, el portador comprende polisacáridos activados por oxidación selectiva de dioles vecinales cíclicos de 1,2-, 1,4-, 1,6- y 2,6-piranosidos, y 1,2-, 1,5-, 1,6-furanosidos, o por oxidación de polisacáridos que contienen 6-hidroxi y 5,6-diol laterales antes de la conjugación con moléculas de fármaco o PBRM.

En todavía otras disposiciones, el portador polimérico comprende un poliactal biocompatible biodegradable en donde al menos un subconjunto de las unidades estructurales repetidas de poliactal tienen la siguiente estructura química:



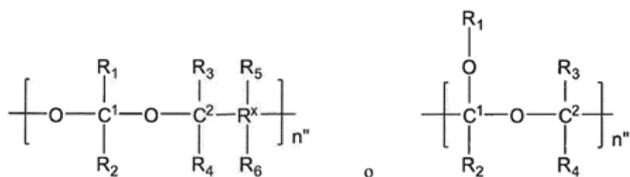
- 15 en donde para cada presencia de la estructura n entre corchetes, uno de R₁ y R₂ es hidrógeno, y el otro es un grupo biocompatible e incluye un átomo de carbono unido covalentemente a C¹; R^x es un átomo de carbono unido covalentemente a C²; n'' es un entero; cada presencia de R₃, R₄, R₅ y R₆ es un grupo biocompatible y es independientemente hidrógeno o una unidad estructural orgánica; y para cada presencia de la estructura n entre corchetes, al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ comprenden un grupo funcional adecuado para el acoplamiento.
- 20 En ciertas realizaciones, el grupo funcional es una unidad estructural hidroxilo.

En una disposición, el portador polimérico comprende polímeros biocompatibles biodegradables hidrófilos activados que comprenden de 0.1% a 100% de unidades estructurales de poliactal cuyo esqueleto está representado por la siguiente estructura química:



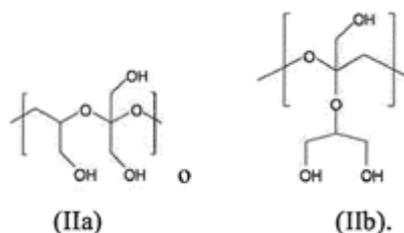
- 25 en donde:
- R₇ y R₈ son independientemente hidrógeno, hidroxilo, hidroxi alquilo (por ejemplo, -CH₂OH, -CH(OH)-CH₂OH), -CHO, -CH(OH)-CHO o -carbonilo; y
- o es un entero de 20 a 2000.

- 30 En aún otras disposiciones, el portador polimérico comprende un policetal biocompatible biodegradable en donde al menos un subconjunto de las unidades estructurales repetibles de policetal tienen la siguiente estructura química:



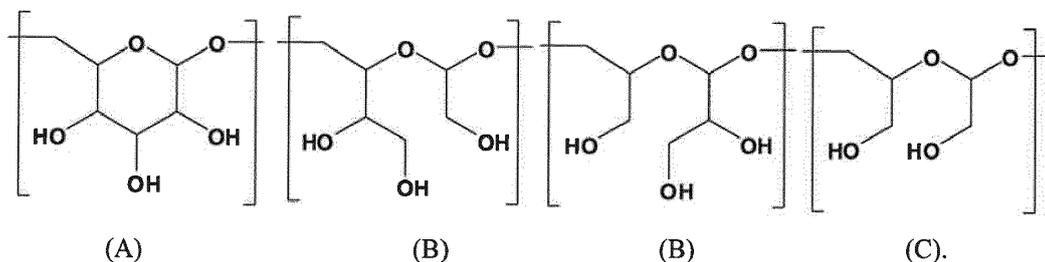
en donde cada presencia de R₁ y R₂ es un grupo biocompatible y R^x, R₃, R₄, R₅, R₆ y son como se definen aquí.

En ciertas disposiciones, las unidades cetales son monómeros de Fórmula (IIa) o (IIb):



Los polímeros policetal biodegradables y biocompatibles y sus métodos de fabricación se han descrito en las patentes U.S. Nos. 5,811,510, 7,790,150 y 7,838,619.

- 5 En una disposición, el portador polimérico puede obtenerse a partir de dextrano parcialmente oxidado ($\beta 1 \rightarrow 6$ -D-glucosa) seguido de reducción. En esta realización, el polímero comprende una mezcla aleatoria de dextrano no modificado (A), unidades de acetal de dextrano parcialmente oxidadas (B) y unidades de acetal (C) de dextrano exhaustivas de las siguientes estructuras:

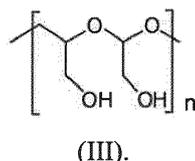


- 10 En otra disposición, el portador polimérico comprende unidades de acetal no modificadas, es decir, segmentos de poliactal. En algunas disposiciones, los poliactales pueden derivarse de dextrano exhaustivamente oxidado seguido de reducción. Estos polímeros se han descrito en las referencias, véase, por ejemplo, la patente U.S. No. 5,811,510 para su descripción de poliactales en la columna 2, línea 65 a columna 8, línea 55 y su síntesis en columna 10, línea 45 a columna 11, línea 14. En una realización, el polímero de poliactal no modificado es un polímero de poli(hidroximetil-etilen hidroximetilo formal) (PHF).

- 15 Además de los polímeros de poli(hidroximetil-etilen hidroximetilo formal), el esqueleto del portador polimérico también puede comprender copolímeros de bloques de poli(hidroximetil-etilen hidroximetilo formal) y otros monómeros o polímeros de acetal o no acetal. Por ejemplo, los polímeros de polietilenglicol son útiles como agentes sigilosos en el esqueleto del polímero debido a que pueden disminuir las interacciones entre las cadenas laterales del polímero de los grupos funcionales adjuntos. Tales grupos también pueden ser útiles para limitar interacciones tales como entre los factores séricos y el polímero modificado. Otros monómeros de agentes sigilosos para incluir en el esqueleto del polímero incluyen, por ejemplo, etilenimina, ácido metacrílico, acrilamida, ácido glutámico y combinaciones de los mismos.

- 25 Las unidades de acetal o cetal están presentes en el polímero modificado en una cantidad efectiva para promover la biocompatibilidad. La unidad de acetal o cetal no modificada se puede describir como un "agente sigiloso" que proporciona biocompatibilidad y solubilidad a los polímeros modificados. Además, la conjugación con un poliactal o un polímero policetal puede modificar la susceptibilidad al metabolismo y la degradación de las unidades estructurales adheridas a él, e influir en la biodistribución, el aclaramiento y la degradación.

Las unidades de acetal no modificadas son monómeros de Fórmula (III):



- 30 La fracción n molar, de unidades de poliactal no modificadas es la fracción molar disponible para promover la biocompatibilidad, solubilidad y el aumento de la vida media, con base en el número total de unidades de polímero en el polímero modificado. La fracción n molar puede ser la fracción mínima de unidades de acetal de monómero no modificadas necesarias para proporcionar biocompatibilidad, solubilidad, estabilidad o una vida media particular, o puede ser una fracción mayor. El grado más deseable de citotoxicidad es sustancialmente ninguno, es decir, el polímero modificado es sustancialmente inerte para el sujeto. Sin embargo, tal como entienden los expertos en la

Agentes terapéuticos

5 El agente terapéutico es una molécula pequeña que tiene un peso molecular preferiblemente \leq aproximadamente 5 kDa, más preferiblemente \leq aproximadamente 4 kDa, más preferiblemente \leq aproximadamente 3 kDa, lo más preferiblemente \leq aproximadamente 1.5 kDa o \leq aproximadamente 1 kDa.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico tiene una IC_{50} de aproximadamente menos de 1 nM.

En otra realización, el agente terapéutico tiene una IC_{50} de aproximadamente mayor que 1 nM, por ejemplo, el agente terapéutico tiene una IC_{50} de aproximadamente 1 a 50 nM.

10 Algunos agentes terapéuticos que tienen una IC_{50} mayor que aproximadamente 1 nM (por ejemplo, "fármacos menos potentes") no son adecuados para la conjugación con una PBRM utilizando técnicas de conjugación reconocidas en la técnica. Sin desear estar limitados por la teoría, tales agentes terapéuticos tienen una potencia que es insuficiente para su uso en conjugados de PBRM-fármaco dirigidos que utilizan técnicas convencionales como copias suficientes del fármaco (es decir, más de 8) no pueden conjugarse usando técnicas reconocidas en la técnica sin dar como resultado propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas disminuidas del conjugado. Sin embargo, se pueden lograr

15 cargas suficientemente altas de estos fármacos menos potentes utilizando las estrategias de conjugación descritas en el presente documento, lo que da como resultado cargas altas del agente terapéutico mientras se mantienen las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas deseables. Por lo tanto, la invención también se refiere a un conjugado de PBRM-polímero-fármaco que incluye una PBRM, PHF y al menos ocho unidades estructurales de agente terapéutico, en donde el agente terapéutico tiene una IC_{50} mayor que aproximadamente 1 nM.

20 En ciertas realizaciones, aproximadamente 0.3 a aproximadamente 15% de monómeros comprenden un agente terapéutico, más preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 12%, e incluso más preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 10%.

25 Los agentes terapéuticos de molécula pequeña utilizados en esta invención (por ejemplo, agentes antiproliferativos (citotóxicos y citostáticos) que pueden unirse a un portador polimérico) incluyen compuestos citotóxicos (por ejemplo, amplio espectro), inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la progresión del ciclo celular, Inhibidores de la ruta PI3K/m-TOR/AKT, inhibidores de la ruta de señalización MAPK, inhibidores de la quinasa, inhibidores de las proteínas chaperonas, inhibidores de la HDAC, inhibidores de la PARP, inhibidores de la ruta de señalización Wnt/Hedgehog e inhibidores de la ARN polimerasa.

30 Las citotoxinas de amplio espectro incluyen, pero no se limitan a, fármacos de unión al ADN, intercalantes o alquilantes, agentes estabilizadores y desestabilizantes de microtúbulos, compuestos de platino, inhibidores de la topoisomerasa I e inhibidores de la síntesis de proteínas.

35 Entre los ejemplos de fármacos de unión, intercalación o alquilación del ADN, CC-1065 y sus análogos, antraciclinas (doxorubicina, epirubicina, idarubicina, daunorubicina, nemorubicina y sus derivados, PNU-159682), compuestos de bisnafalalimida tal como elinafide (Estados Unidos) y sus análogos, agentes alquilantes, tales como caliqueamicinas, dactinomycinas, mitromycinas, pirrolobenzodiazepinas y similares. Los análogos de CC-1065 de ejemplo incluyen duocarmicina SA, duocarmicina A, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina D, DU-86, KW-2189, adozelesina, bizelesina, carzelesina, seco-adozelesina, y análogos relacionados y formas de profármacos, cuyos ejemplos se describen en las patentes U.S. Nos. 5,475,092; 5,595,499; 5,846,545; 6,534,660; 6,586,618; 6,756,397 y 7,049,316. La doxorubicina y sus análogos incluyen los descritos en la Patente U.S. N° 6,630,579. Las caliqueamicinas incluyen, por ejemplo, enediinas, por ejemplo, esperamicina, y las descritas en las patentes U.S. Nos 5,714,586 y 5,739,116. Las duocarmicinas incluyen las descritas en las patentes U.S. Nos. 5,070,092; 5,101,038; 5,187,186; 6,548,530; 6,660,742; y 7,553,816 B2; y Li et al., Tet Letts., 50:2932 - 2935 (2009).

40

Las pirrolobenzodiazepinas (PBD) y sus análogos incluyen las descritas en Denny, Exp. Opin. Ther. Patents., 10(4):459-474 (2000) y Antonow and Thurston, Chem Rev., 2815-2864 (2010).

45 Los agentes de estabilización y desestabilización de microtúbulos de ejemplos incluyen compuestos de taxano, tales como paclitaxel, docetaxel, tesetaxel y carbazitaxel; maitansinoides, auristatinas y análogos de los mismos, derivados de alcaloides vinca, eptilonas y criptoficinas.

50 Ejemplos de maitansinoides o análogos de maitansinoides incluyen maitansinol y análogos de maitansinol, la maitansina o la DM-1 y la DM-4 son las descritas en las patentes U.S. Nos. 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,441,163; 6,716,821; RE39,151 y 7,276,497. En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131), maitansinoides o análogos de maitansinoides. Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides adecuados se divulgan en las patentes U.S. Nos. 4,424,219; 4,256,746; 4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348; 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; y 5,846,545.

55

- Las auristatinas de ejemplo incluyen auristatina E (también conocida como un derivado de dolastatina-10), auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatinina E (MMAF), auristatin Fc (EMA), monometil auristatin F (MMAF), auristatinina en un grupo de personas de la misma categoría. AFP), auristatina F HPA y dolastatina. Las auristatinas adecuadas también se describen en las publicaciones U.S. Nos. 2003/0083263, 2011/0020343 y 2011/0070248; Publicación de Solicitud PCT Nos. WO 09/117531, WO 2005/081711, WO 04/010957; WO 02/088172 y WO01/24763, y Patentes U.S. Nos. 7,498,298; 6,884,869; 6,323,315; 6,239,104; 6,124,431; 6,034,065; 5,780,588; 5,767,237; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; y 4,486,414.
- Alcaloides vinca de ejemplo incluyen vincristina, vinblastina, vindesina y navelbina (vinorelbina). Los alcaloides Vinca adecuados que se pueden usar en la presente invención también se divulgan en las publicaciones U.S. Nos. 2002/0103136 y 2010/0305149, y en la Patente U.S. No. 7,303,749 B1.
- Los compuestos de epotilona de ejemplo incluyen epotilona A, B, C, D, E y F, y derivados de los mismos. Los compuestos de epotilona adecuados y sus derivados se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 6,956,036; 6,989,450; 6,121,029; 6,117,659; 6,096,757; 6,043,372; 5,969,145; y 5,886,026; y WO 97/19086; WO 98/08849; WO 98/22461; WO 98/25929; WO 98/38192; WO 99/01124; WO 99/02514; WO 99/03848; WO 99/07692; WO 99/27890; y WO 99/28324.
- Los compuestos de criptocina de ejemplo se describen en las patentes U.S. números 6,680,311 y 6,747,021.
- Los compuestos de platino de ejemplo incluyen cisplatino (PLATINOL®), carboplatino (PARAPLATIN®), oxaliplatino (ELOXATINE®), iproplatino, ormaplatino y tetraplatino.
- Se pueden seleccionar otras clases de compuestos o compuestos con estos u otros modos de acción citotóxicos, que incluyen, por ejemplo, mitomicina C, mitomicina A, daunorubicina, doxorubicina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, aminopterina, bleomicina, 1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-ol, pirrolobenzodiazepina (PBD) poliamida y sus dímeros. Otros agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, puromicinas, topotecán, rizoxina, equinomicina, combretastatina, netropsina, estramustina, criptofisinas, cemadotina, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.
- Los inhibidores de la topoisomerasa I de ejemplo incluyen camptotecina, derivados de la camptotecina, análogos de la camptotecina y las camptotecinas no naturales, tales como, por ejemplo, CPT-11 (irinotecan), SN-38, GI-147211C, topotecan, 9-aminocamptotecina, 7-toxina 7-aminometil camptotecina, 10-hidroxycamptotecina, (20S)-camptotecina, rubitecan, gimatecan, karenitecin, silatecan, lurtotecan, exatecan, diflomotecan, belotecan, lurtotecan y S39625. Otros compuestos de camptotecina que se pueden usar en la presente invención incluyen los descritos, por ejemplo, en J. Med. Chem., 29:2358-2363 (1986); J. Med. Chem., 23:554 (1980); J. Med. Chem., 30:1774 (1987).
- Los inhibidores de la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de MetAP2, inhibidores de VEGF, inhibidores de PIGF, inhibidores de VGFR, inhibidores de PDGFR, inhibidores de MetAP2. Los inhibidores de VGFR y PDGFR de ejemplo incluyen sorafenib (Nexavar), sunitinib (Sutent) y vatalanib. Los inhibidores de MetAP2 de ejemplo incluyen análogos de fumagilol, es decir, cualquier compuesto que incluya la estructura central de la fumagilina, incluida la fumagilamina, que inhibe la capacidad de MetAP-2 para eliminar las metioninas NH₂-terminales de las proteínas como se describe en Rodeschini et al., J. Org. Chem., 69, 357-373, 2004 y Liu, et al., Science 282, 1324-1327, 1998. Se describen ejemplos no limitantes de "análogos de fumagilol" en J. Org. Chem., 69, 357, 2004; J. Org. Chem., 70, 6870, 2005; Solicitud de Patente Europea 0 354 787; J. Med. Chem., 49, 5645, 2006; Bioorg. Medicina. Chem., 11, 5051, 2003; Bioorg. Medicina. Chem., 14, 91, 2004; Tet. Letón. 40, 4797, 1999; WO99/61432; Las patentes U.S. Nos. 6,603,812; 5,789,405; 5,767,293; 6,566,541; y 6,207,704.
- Los inhibidores de la progresión del ciclo celular de ejemplo incluyen inhibidores de CDK tales como, por ejemplo, BMS-387032 y PD0332991; Inhibidores de la Rho-quinasa tales como, por ejemplo, GSK429286; inhibidores de la quinasa del punto de control tales como, por ejemplo, AZD7762; inhibidores de la aurora quinasa tales como, por ejemplo, AZD1152, MLN8054 y MLN8237; Inhibidores de PLK tales como, por ejemplo, BI 2536, BI6727 (Volasertib), GSK461364, ON-01910 (Etybon); e inhibidores de KSP tales como, por ejemplo, SB 743921, SB 715992 (ispinesib), MK-0731, AZD8477, AZ3146 y ARRY-520.
- Los inhibidores de la ruta de señalización PI3K/m-TOR/AKT de ejemplo incluyen inhibidores de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), inhibidores de GSK-3, inhibidores de ATM, inhibidores de ADN-PK e inhibidores de PDK-1.
- Los inhibidores de PI3 quinasa de ejemplo se divulgan en la patente U.S. N° 6,608,053, e incluyen BEZ235, BGT226, BKM120, CAL101, CAL263, demetoxiviridin, GDC-0941, GSK615, IC87114, LY294002, Palomid 529, perifosine, PI-103, PF-04691502, PX-866, SAR245408, SAR245409, SF1126, Wortmannin, XL147 y XL765.
- Los inhibidores de AKT de ejemplo incluyen, pero no se limitan a AT7867.
- Los inhibidores de la ruta de señalización MAPK de ejemplo incluyen los inhibidores de MEK, Ras, JNK, B-Raf y p38 MAPK.

Los inhibidores de MEK de ejemplo se divulgan en la patente U.S. No. 7,517,994 e incluyen GDC-0973, GSK1120212, MSC1936369B, AS703026, RO5126766 y RO4987655, PD0325901, AZD6244, AZD 8330 y GDC-0973.

Los inhibidores de B-raf de ejemplo incluyen CDC-0879, PLX-4032 y SB590885.

Los inhibidores de MAPK p38 de ejemplo incluyen BIRB 796, LY2228820 y SB 202190.

- 5 Las tirosina quinasas receptoras (RTK) son receptores de la superficie celular que a menudo se asocian con rutas de señalización que estimulan la proliferación incontrolada de células cancerosas y la neoangiogénesis. Se han identificado muchas RTK, que expresan en exceso o tienen mutaciones que conducen a la activación constitutiva del receptor, incluidos, pero no limitados a, los receptores de la familia de receptores VEGFR, EGFR, FGFR, PDGFR, EphR y RET. Los objetivos RTK específicos de ejemplo incluyen ErbB2, FLT-3, c-Kit y c-Met.

- 10 Los inhibidores de ejemplo del receptor ErbB2 (familia EGFR) incluyen pero no se limitan a AEE788 (NVP-AEE 788), BIBW2992, (Afatinib), Lapatinib, Erlotinib (Tarceva) y Gefitinib (Iressa).

- 15 Los inhibidores de RTK de ejemplo que se dirigen a más de una ruta de señalización (inhibidores de quinasa de múltiples objetivos) incluyen AP24534 (Ponatinib) que se dirige a receptores de FGFR, FLT-3, VEGFR-PDGFR y Bcr-Abl; ABT-869 (Linifanib) que se dirige a los receptores FLT-3 y VEGFR-PDGFR; AZD2171 que se dirige a los receptores VEGFR-PDGFR, Flt-1 y VEGF; CHR-258 (Dovitinib) que se dirige a los receptores VEGFR-PDGFR, FGFR, Flt-3 y c-Kit; Sunitinib (Sutent) que se dirige a VEGFR, PDGFR, KIT, FLT-3 y CSF-1R; Sorafenib (Nexavar) y Vatalanib dirigidos a VEGFR, PDGFR así como a serina/treonina quinasas intracelulares en la ruta Raf/Mek/Erk.

Los inhibidores chaperón de proteínas de ejemplo incluyen inhibidores de HSP90. Los inhibidores de HSP90 de ejemplo incluyen derivados de 17AAG, BIIB021, BIIB028, SNX-5422, NVP-AUY-922 y KW-2478.

- 20 Los inhibidores de la HDAC de ejemplo incluyen Belinostat (PXD101), CUDC-101, Droxinostat, ITF2357 (Givinostat, Gavinostat), JNJ-26481585, LAQ824 (NVP-LAQ824, DZ-589 (Panobinostat))-275 (Entinostat), PCI-24781, Piroxamida (NSC 696085), SB939, Tricostatina A y Vorinostat (SAHA).

Los inhibidores de PARP de ejemplo incluyen iniparib (BSI 201), olaparib (AZD-2281), ABT-888 (Veliparib), AG014699, CEP 9722, MK 4827, KU-0059436 (AZD2281), LT-673, 3-aminobenzamida, A-959492, y AZD2461.

- 25 Los inhibidores de la ruta de señalización Wnt/Hedgehog de ejemplo incluyen vismodegib (RG3616/GDC-0449), ciclopamina (11-deoxojervina) (inhibidores de la ruta de Hedgehog) y XAV-939 (inhibidor de la ruta Wnt)

Los inhibidores de la ARN polimerasa de ejemplo incluyen amatoxinas. Las amatoxinas de ejemplo incluyen α -amanitinas, β -amanitinas, γ -amanitinas, ϵ -amanitinas, amanulina, ácido amanulínico, amaninamida, amanina y proamanulina.

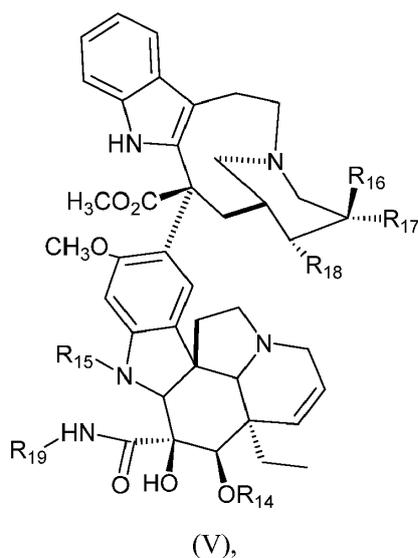
- 30 Inhibidores de la síntesis de proteínas de ejemplo incluyen compuestos de tricoteceno.

- 35 En una realización, el fármaco de la invención es un inhibidor de topoisomerasa (tal como, por ejemplo, un compuesto de camptotecina no natural), alcaloide vinca, inhibidor de la quinasa (por ejemplo, inhibidor de la PI3 quinasa (GDC-0941 y PI-103)), inhibidor de MEK, inhibidor de la KSP, inhibidor de la ARN polimerasa, inhibidor de la síntesis de proteínas, inhibidor de la PARP, docetaxel, paclitaxel, doxorubicina, duocarmicina, auristatina, dolastatin, caliqueamicinas, topotecan, SN38, camptotecina, exatecan, nemorubicina y sus derivados, PNU-159682, CC1065, elinafida, tricoteceno, pirrolobenzodiazepinas, maitansinoides, fármacos de unión al ADN o un compuesto de platino, y análogos de los mismos. En realizaciones específicas, el fármaco es un derivado de SN-38, camptotecina, topotecán, exatecán, caliqueamicina, exatecán, nemorubicina, PNU-159682, antraciclina, maitansinoide, taxano, tricoteceno, CC1065, elinafide, vindesina, vinblastina, PI-103, AZD 8330, dolastatina, auristatina E, auristatina F, un compuesto duocarmicina, ispinesib, pirrolobenzodiazepina, ARRY-520 y estereoisómeros, isómeros y análogos de los mismos.

- 40 En otra realización, el fármaco utilizado en la invención es una combinación de dos o más fármacos, tales como, por ejemplo, inhibidores de la PI3 quinasa e inhibidores de MEK; Compuestos citotóxicos de amplio espectro y compuestos de platino; Inhibidores de PARP y compuestos de platino; compuestos citotóxicos de amplio espectro e inhibidores de la PARP.

- 45 En aún otra realización, el fármaco usado en la invención es auristatina F-hidroxipropilamida-L-alanina.

En una realización, el alcaloide vinca es un compuesto de Fórmula (V):



en donde:

R₁₄ es hidrógeno, -C(O)-C₁₋₃ alquilo o C₁₋₃alquilo sustituido con -C(O)-cloro;

R₁₅ es hidrógeno, -CH₃ o -CHO;

- 5 cuando R₁₇ y R₁₈ se toman independientemente, R₁₈ es hidrógeno, y cualquiera de R₁₆ o R₁₇ es etilo y el otro es hidroxilo;

cuando R₁₇ y R₁₈ se toman junto con el carbono al que están unidos para formar un anillo oxirano, R₁₆ es etilo;

R₁₉ es hidrógeno, OH, grupo amino, alquilamino o -[C(R₂₀R₂₁)_a]-R₂₂;

- 10 cada uno de R₂₀ y R₂₁ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, C₆₋₁₀ arilo C₆₋₁₀ hidroxilado, arilo C₆₋₁₀ polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C₃₋₈, cicloalquilo C₃₋₈ hidroxilado, cicloalquilo C₃₋₈ polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R₂₂ es -OH, -NH₂, -COOH, -R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃), -R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(O CH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃) o -R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇;

cada R₂₃ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₈, -COOH, o -COO-alquilo-C₁₋₆;

- 15 X² es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R₇₇ es hidrógeno o X² y NR₇₇ formar una unidad estructural heterocíclico que contiene nitrógeno;

R₈₂ es -NH u oxígeno;

a es un entero de 1 a 6;

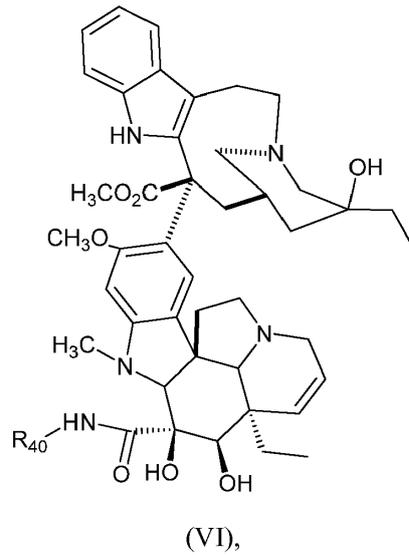
c es un entero de 0 a 3;

- 20 d es un entero de 1 a 3; y

f es un entero de 1 a 12.

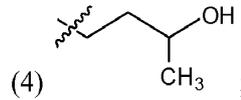
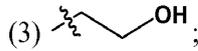
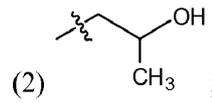
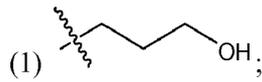
Ejemplos adicionales de alcaloides Vinca se describen en los documentos US8524214B2 y US 2002/0103136.

En una realización, el alcaloide vinca de Fórmula (V) es un compuesto de Fórmula (VI):

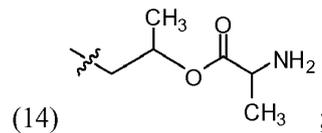
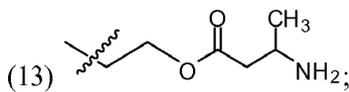
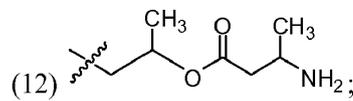
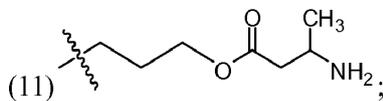
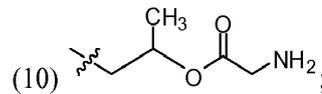
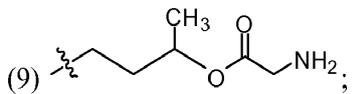
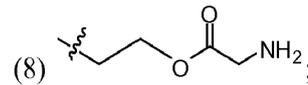
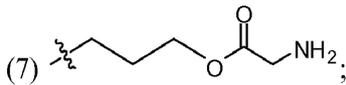
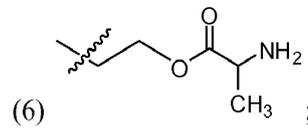
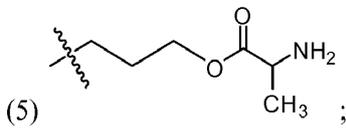


en donde:

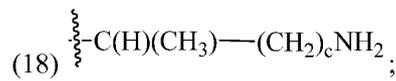
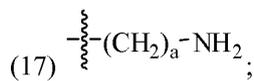
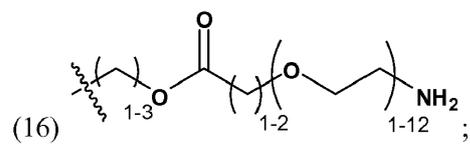
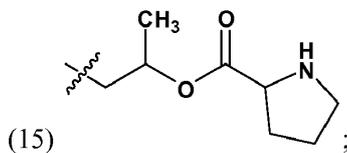
R₄₀ es hidrógeno, -OH, -NH₂, o cualquiera de las siguientes estructuras:

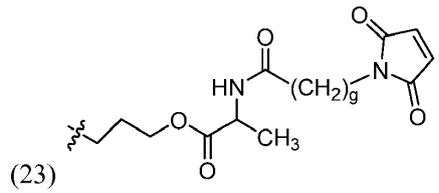
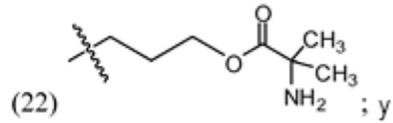
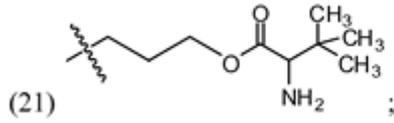
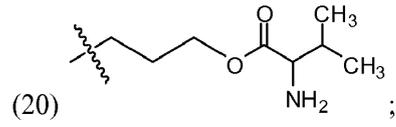
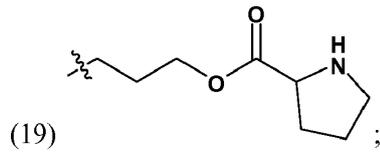


5



10

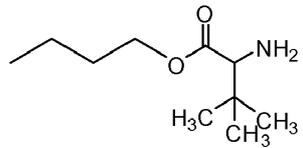
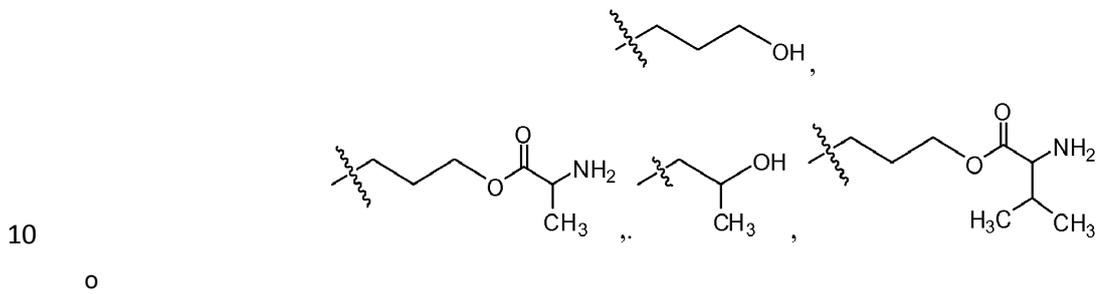




en donde:

- 5 a es un entero de 1 a 6;
g es un entero de 2 a 6; y
c es un entero de 0 a 3.

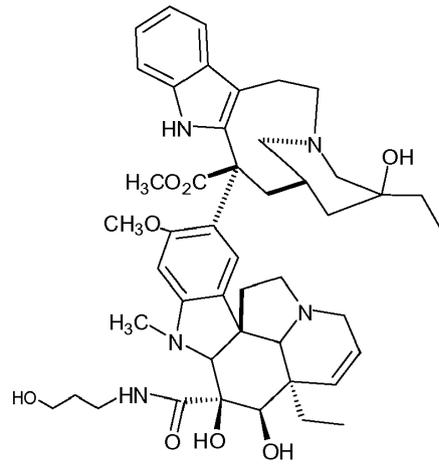
En una realización, en la Fórmula (VI), R₄₀ es



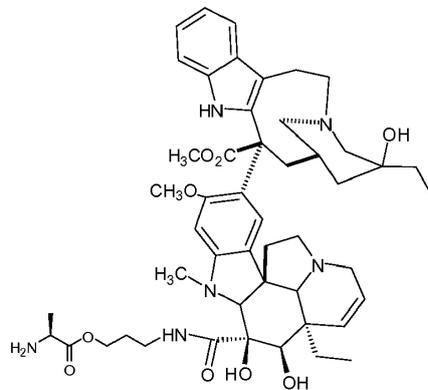
En otra realización, R₄₀ es



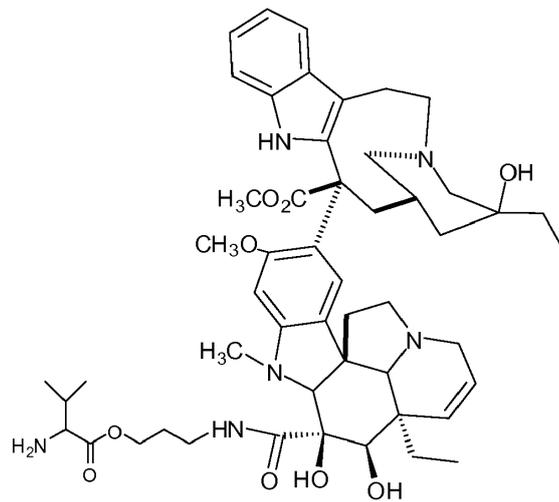
- 15 En otra realización, el compuesto de Fórmula (VI) es un compuesto de Fórmula (VIa), (VIb), (VIc) o (VI d):



(VIa),

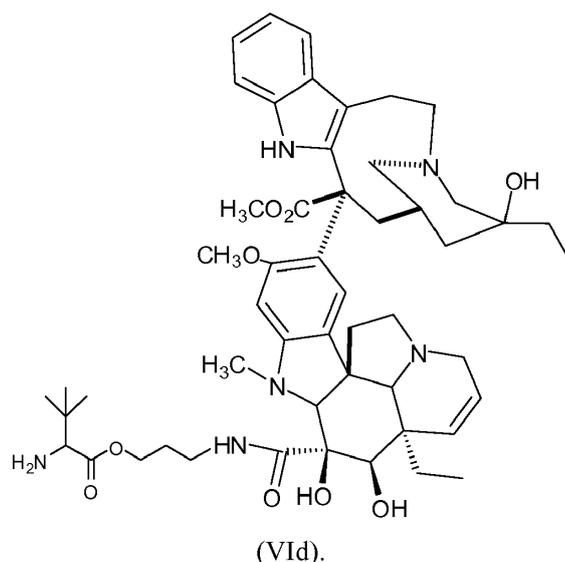


(VIb),

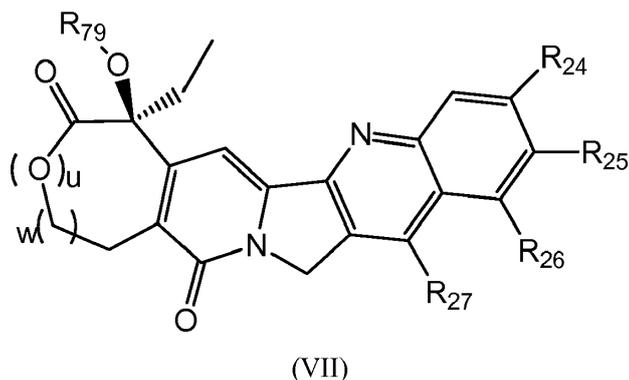


(VIc),

o



En otra realización, el inhibidor de topoisomerasa es un compuesto de camptotecina de Fórmula (VII):



en donde:

- 5 R_{24} es -H, -Cl, -F, -OH o alquilo; o R_{24} y R_{25} , se pueden tomar juntos para formar un anillo de cinco o seis miembros opcionalmente sustituido;
- R_{25} es -H, -F, -OH, -CH₃, -CH=N-O-t-butilo, -CH₂CH₂Si(CH₃)₃, -Si((CH₃)₂)-t-butilo, -O-C(O)-R₂₉;
- R_{29} es -NH₂, -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-R₂₂, heterocicloalquilo de 5 a 12 miembros, R₂₈-heterocicloalquilo C₃₋₁₂-alquilo C₁₋₆-R₂₂ o -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-arilo C₆₋₁₂-alquilo-C₁₋₆-R₂₂; o R_{29} es R_{47} como se define aquí;
- 10 R_{26} es -H, -CH₂-N(CH₃)₂, NH₂, o NO₂;
- R_{27} es -H, etiol, N-metil piperidina, cicloalquilo, -CH₂OH, -CH₂CH₂NHCH(CH₃)₂, o -N-4-metilciclohexilamina;
- R_{79} es -H o -C(O)-R₂₈-[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂;
- cada uno de R_{20} y R_{21} es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, C₆₋₁₀ arilo C₆₋₁₀ hidroxilado, arilo C₆₋₁₀ polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C₃₋₈, cicloalquilo C₃₋₈ hidroxilado, cicloalquilo C₃₋₈ polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;
- 15 R_{22} es -OH, -NH₂, -COOH, -R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃), -R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(O CH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃), o -R₈₂-C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇;
- cada R_{23} es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₈, -COOH, o -COO-alquilo-C₁₋₆;
- X² es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;
- 20 R_{77} es un hidrógeno o X² y NR₇₇ formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;
- R_{82} es -NH u oxígeno;

o R_{26} y R_{27} cuando se toman junto con los dos átomos de carbono a los que se unen y el tercer átomo de carbono que conecta los dos átomos de carbono forma un anillo de seis miembros opcionalmente sustituido;

R_{28} está ausente, NH u oxígeno;

a es un entero de 1 a 6;

5 c es un entero de 0 a 3;

d es un entero de 1 a 3;

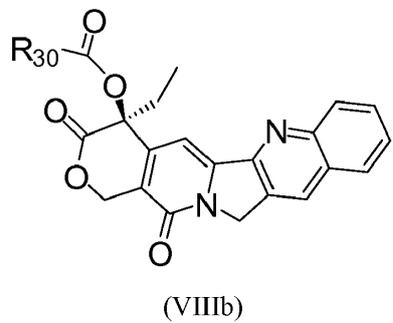
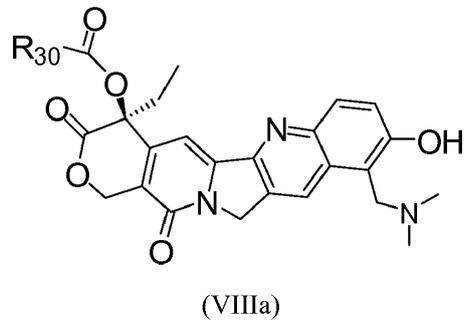
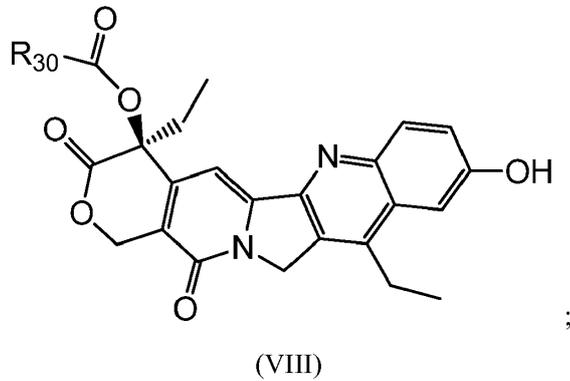
f es un entero de 1 a 12;

u es un entero 0 o 1;

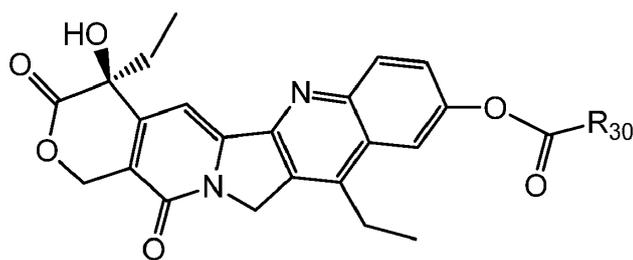
w es un entero 0 o 1; y

10 con la condición de que el compuesto de Fórmula (VII) debe contener al menos uno de R_{29} y R_{79} .

En una realización el compuesto de camptotecina de Fórmula (VII) es un compuesto de Fórmula (VIII), (VIIIa), o (VIIIb), o Fórmula (XXV) o (XXVa):

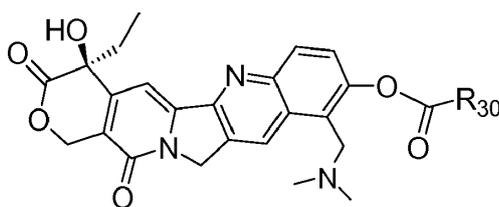


15



(XXV)

o



(XXVa),

5 en donde R_{30} es $-NH_2$, $-R_{28}-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$, $-R_{28}$ -alquilo- C_{1-6} - R_{22} , heterocicloalquilo de 5 a 12 miembros, R_{28} -heterocicloalquilo C_3 - C_{12} -alquilo C_{1-6} - R_{22} o $-R_{28}$ -alquilo- C_{1-6} -arilo C_{6-12} -alquilo- C_{1-6} - R_{22} ;

R_{28} está ausente, NH u oxígeno;

cada uno de R_{20} y R_{21} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, C_{6-10} arilo C_{6-10} hidroxilado, arilo C_{6-10} polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C_{3-8} , cicloalquilo C_{3-8} hidroxilado, cicloalquilo C_{3-8} polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

10 R_{22} es $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ o $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH_d-R_{77}$;

cada R_{23} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-8} , $-COOH$, o $-COO$ -alquilo- C_{1-6} ;

X^2 es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R_{77} es un hidrógeno o X^2 y NR_{77} formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

15 R_{82} es $-NH$ u oxígeno;

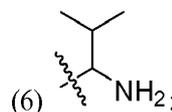
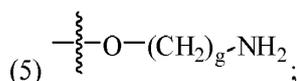
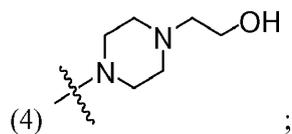
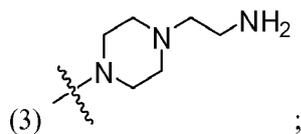
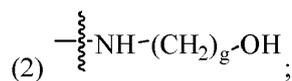
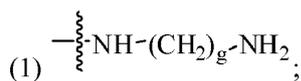
a es un entero de 1 a 6;

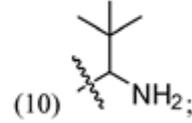
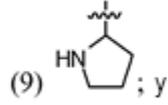
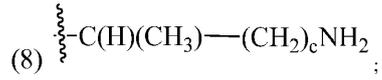
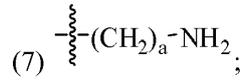
c es un entero de 0 a 3;

d es un entero de 1 a 3; y

f es un entero de 1 a 12.

20 En algunas realizaciones R_{30} es una cualquiera de las siguientes estructuras:





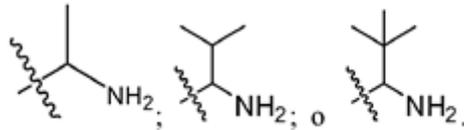
en donde:

a es un entero de 1 a 6;

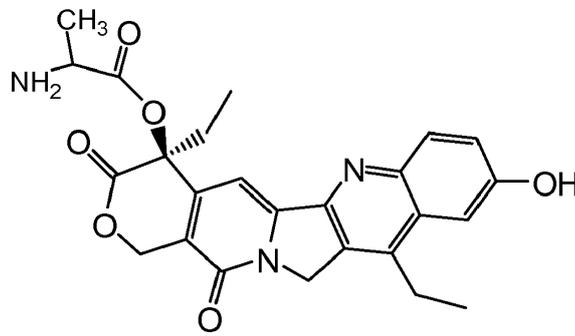
5 c es un entero de 0 a 3; y

g es un entero de 2 a 6.

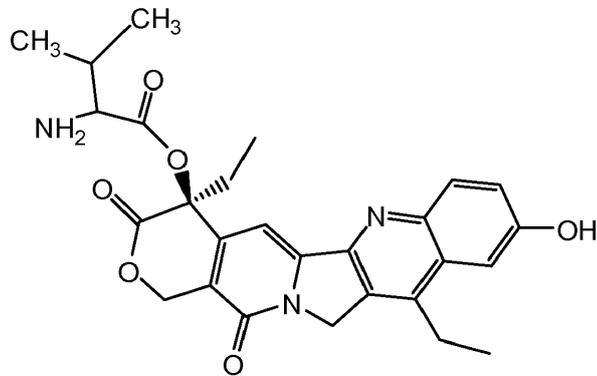
En una realización, en la Fórmula (VII), R₃₀ es:



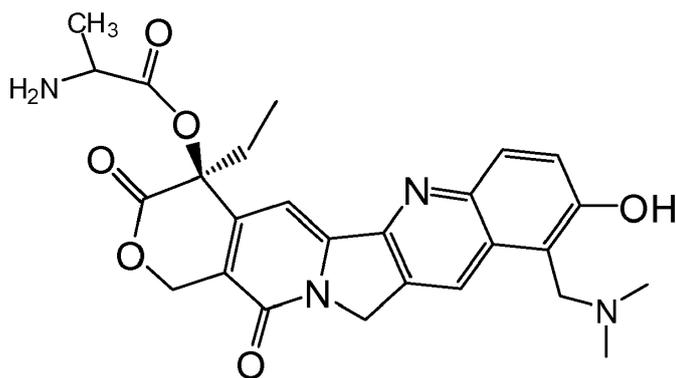
10 En otra realización, el compuesto de Fórmula (VII) es un compuesto de Fórmula (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIIe) o (VIIf):



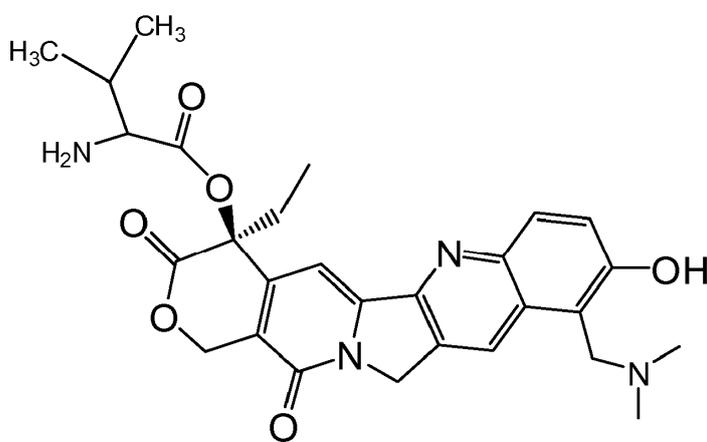
(VIIa)



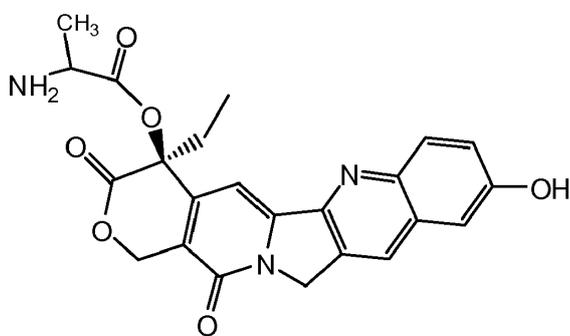
(VIIb)



(VIIc)

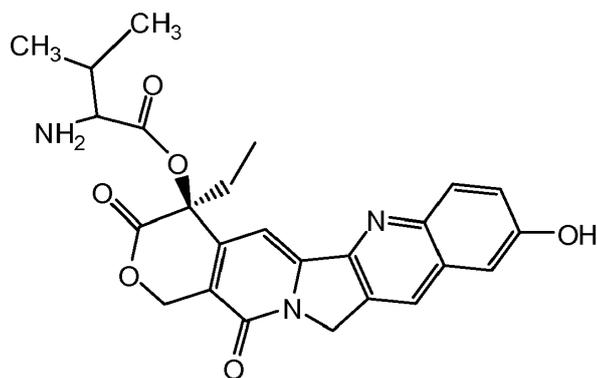


(VIIId)



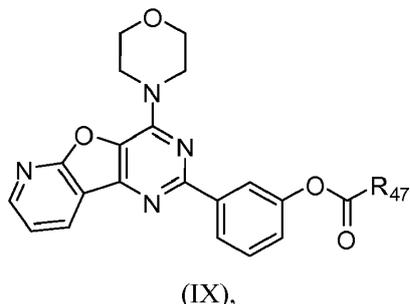
(VIIe),

o



(VIIIf).

En otra realización el inhibidor de PI3 quinasa es un compuesto de Fórmula (IX):



en donde

5 R_{47} es un grupo amino, $-R_9-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{10}$, $-R_9$ -hetero cicloalquilo C_{5-12} alquilo- C_{1-6} - R_{10} , heterocicloalquilo de 5 a 12 miembros, o $-R_9$ -arilo C_{6-10} ;

cada uno de R_{20} y R_{21} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, C_{6-10} arilo C_{6-10} hidroxilado, arilo C_{6-10} polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C_{3-8} , cicloalquilo C_{3-8} hidroxilado, cicloalquilo C_{3-8} polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

10 R_{10} es $-OH$, $-NHR_{83}$, $-N-(R_{83})R_{11}$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH$, $-R_{77}$ o $-R_{82}-C(O)-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{82}-R_{83}$;

cada R_{23} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-8} , $-COOH$, o $-COO$ -alquilo- C_{1-6} ;

X^2 es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

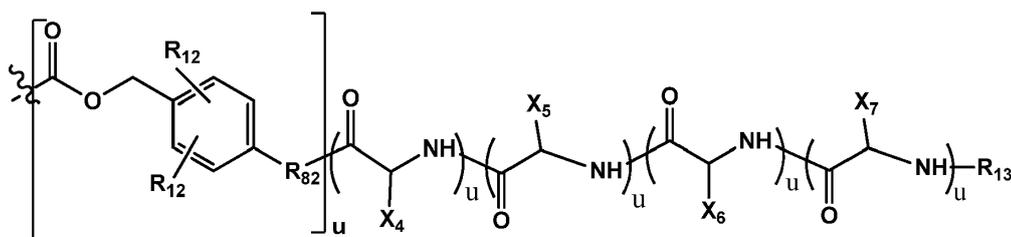
R_{77} es un hidrógeno o X^2 y NR_{77} formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

R_{82} es $-NH$ u oxígeno;

15 R_9 está ausente, $N-(R_{83})$ u oxígeno;

R_{83} es hidrógeno o CH_3 ;

R_{11} es :



cada R_{12} es independientemente hidrógeno, cloruro, $-CH_3$ o $-OCH_3$;

20 R_{13} es hidrógeno o $-C(O)-(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-NH_2$;

R_{82} es $-NH$ u oxígeno

X_4 es la cadena lateral de lisina, arginina, citrulina, alanina o glicina;

X_5 Es la cadena lateral de fenilalanina, valina, leucina, isoleucina o triptófano;

cada uno de X_6 y X_7 es independientemente la cadena lateral de glicina, alanina, serina, valina o prolina;

25 a es un entero de 1 a 6;

c es un entero de 0 a 3;

d es un entero de 1 a aproximadamente 3;

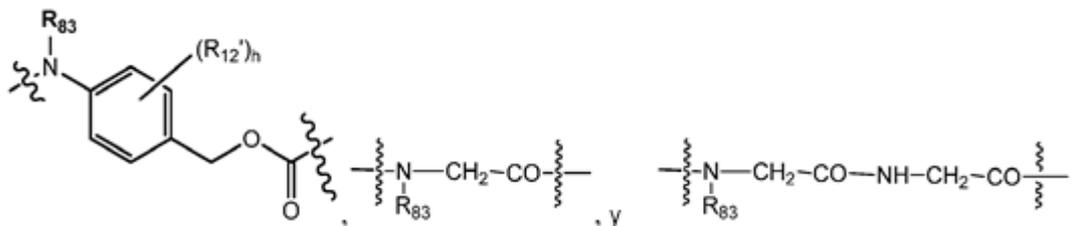
f es un entero de 1 a aproximadamente 12; y

cada u es independientemente un entero 0 o 1;

o R_{11} es $-Y_u-W_q-R_{88}$,

en donde:

Y es una cualquiera de las siguientes estructuras:



5 en cada uno de los cuales el grupo NR_{83} terminal de Y es proximal a R_{88} ;

R_{83} es hidrógeno o CH_3 ;

cada W es una unidad de aminoácidos;

cada R_{12}' independientemente es halógeno, $-C_{1-8}$ alquilo, $-O-C_{1-8}$ alquilo, nitro o ciano;

R_{88} es hidrógeno o $-C(O)-(CH_2)_{ff}-(NH-C(O))_{aa}-E_j-(CH_2)_{bb}-R_{85}$

10 R_{85} es NH_2 o OH ;

E es $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2O-$;

u es un entero 0 o 1;

q es un entero de 0 a 12;

aa es un entero 0 o 1;

15 bb es un entero 0 o 2;

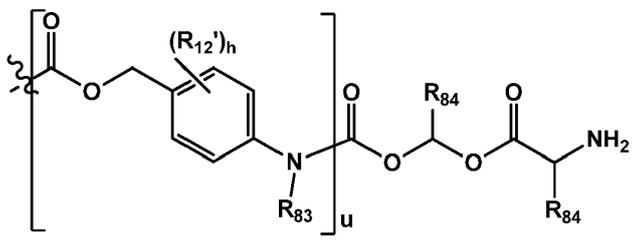
ff es un entero de 0 a 10;

h es un entero de 0 a 4;

j es un entero de 0 a 12; y

cuando E es $-CH_2-$, bb es 0 y j es un entero de 0 a 10; y cuando E es $-CH_2CH_2O-$, bb es 2 y j es un entero de 1 a 12;

20 o R_{11} es



en donde:

R_{83} es hidrógeno o CH_3 ;

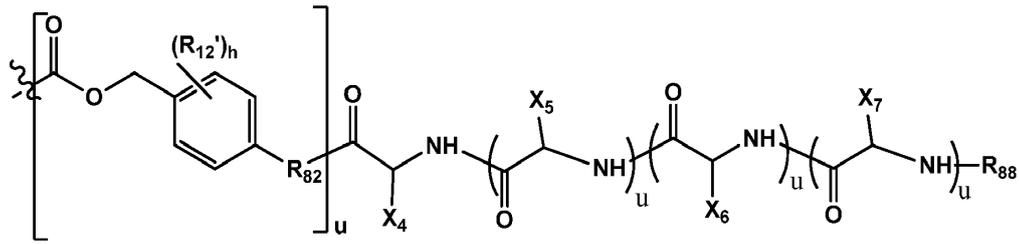
R_{84} es C_{1-6} alquilo o arilo C_{6-10} ;

25 cada R_{12}' independientemente es halógeno, $-C_{1-8}$ alquilo, $-O-C_{1-8}$ alquilo, nitro o ciano;

h es un entero de 0 a 4; y

u es un entero 0 o 1.

En algunas realizaciones, R_{11} es:



en donde:

cada R_{12}' es independientemente cloruro, $-CH_3$ o $-OCH_3$;

R_{88} es hidrógeno o $-C(O)-(CH_2)_{ff}-(CH_2-CH_2O)_j-CH_2-CH_2-NH_2$;

5 R_{82} es $-NH$ u oxígeno

X_4 es la cadena lateral de lisina, arginina, citrulina, alanina o glicina;

X_5 Es la cadena lateral de fenilalanina, valina, leucina, isoleucina o triptófano;

cada uno de X_6 y X_7 es independientemente la cadena lateral de glicina, alanina, serina, valina o prolina;

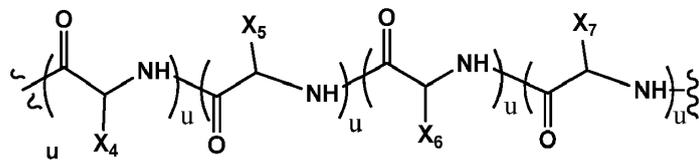
ff es un entero de 1 a 3;

10 j es un entero de 1 a 12

h es un entero de 0 a 4; y

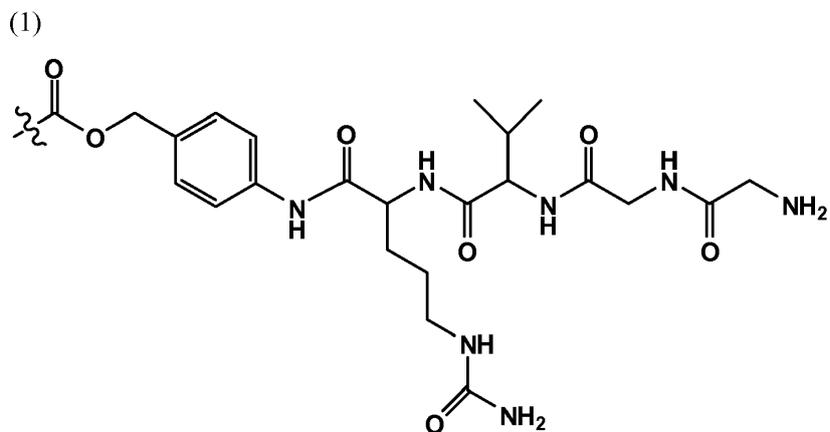
cada u es independientemente un entero 0 o 1.

En algunas realizaciones,

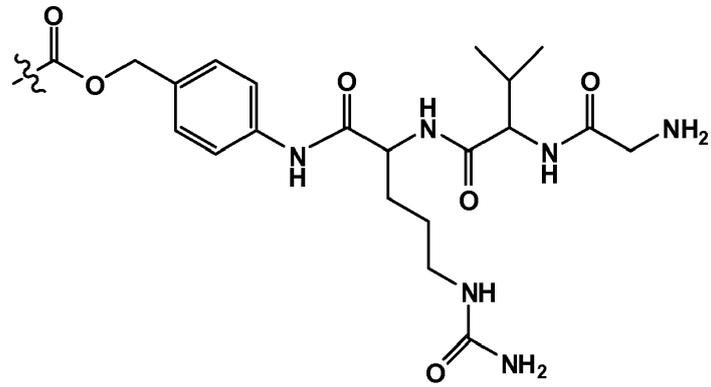


15 es citrulina-valina; lisina-fenilalanina; citrulina-fenilalanina; citrulina-leucina; citrulina-valina-glicina-glicina; glicina-fenilalanina-glicina-glicina; valina; prolina; leucina o isoleucina.

En otra realización, R_{11} es una cualquiera de las siguientes estructuras:

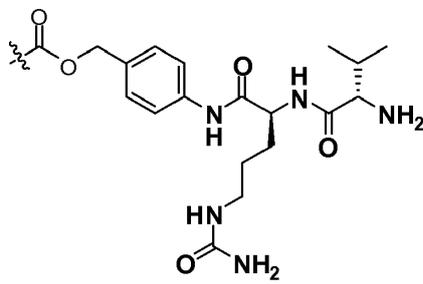


(2)



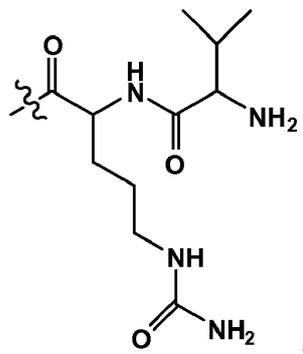
;

(3)



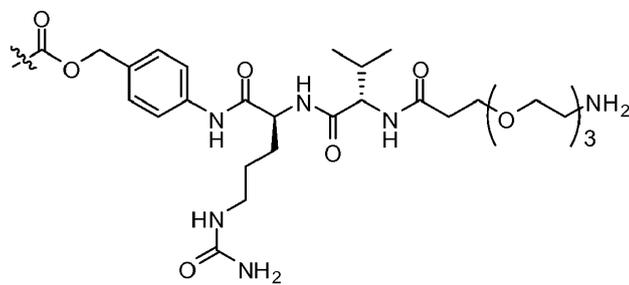
;

(4)



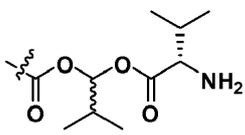
;

(5)



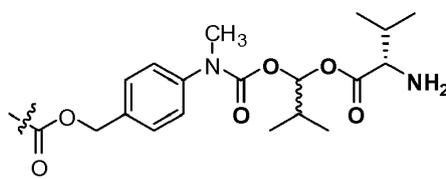
;

(6)

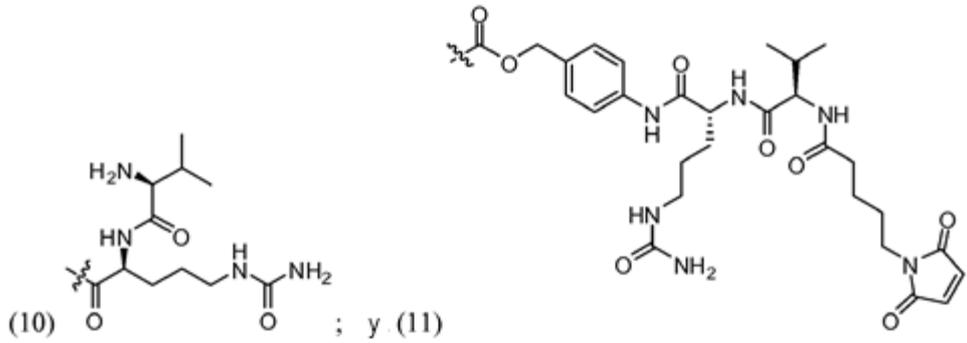
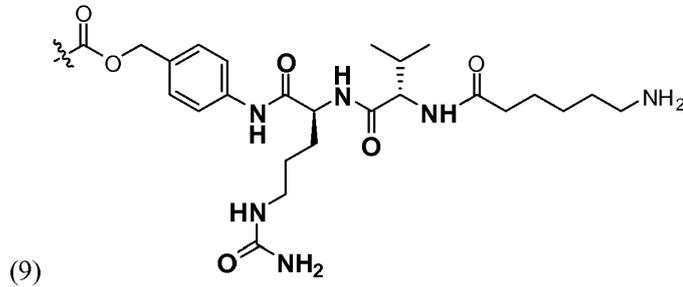
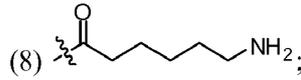


;

(7)

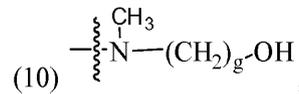
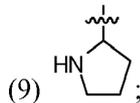
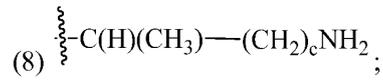
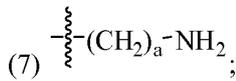
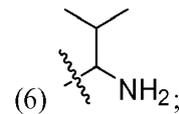
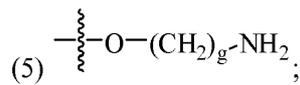
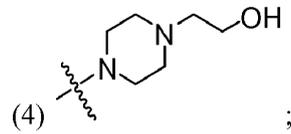
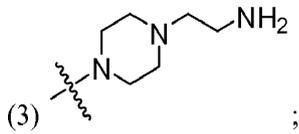
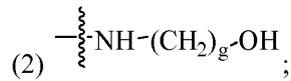
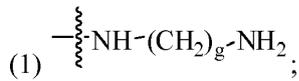


;

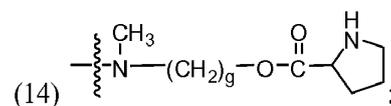
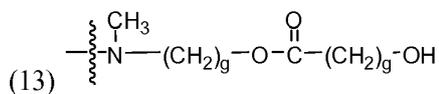
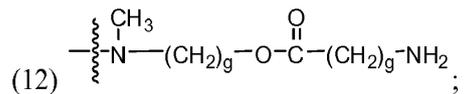
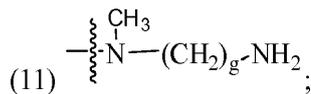


En algunas realizaciones R₄₇ es una cualquiera de las siguientes estructuras:

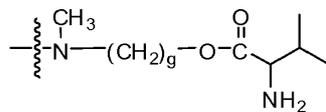
5



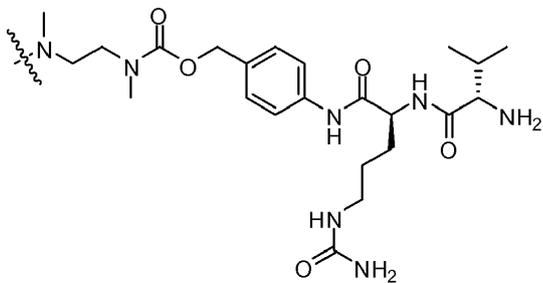
10



(15)

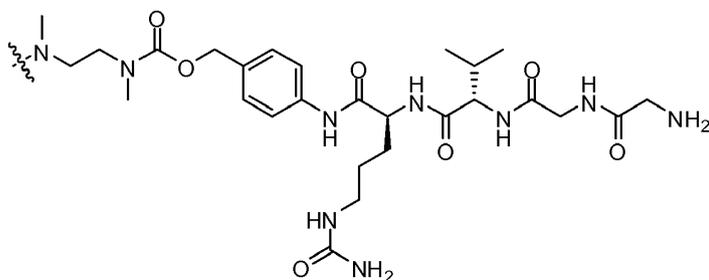


(16)



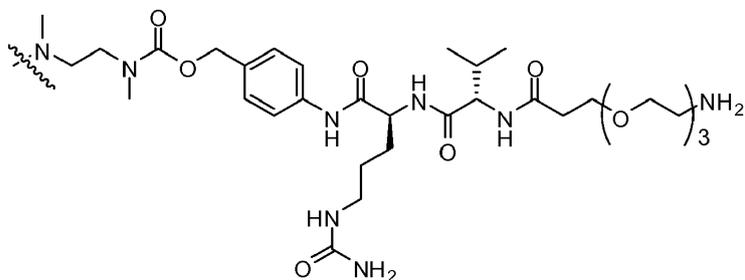
;

(17)



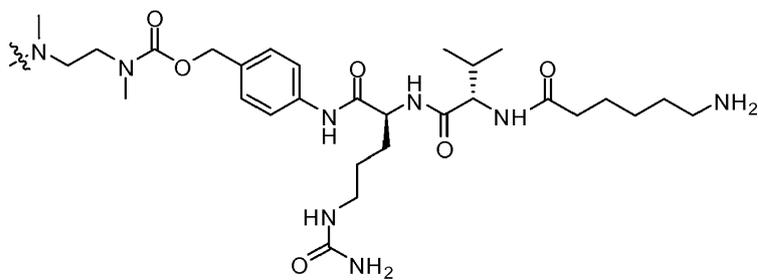
;

(18)

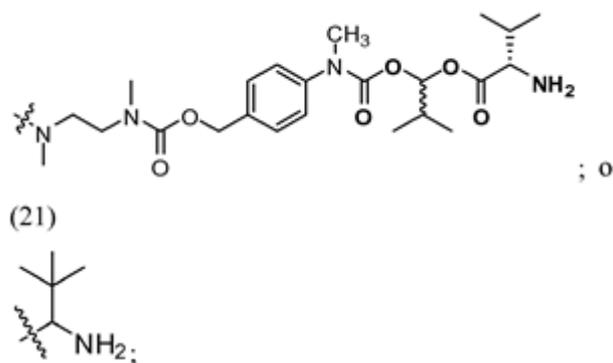


;

(19)



(20)



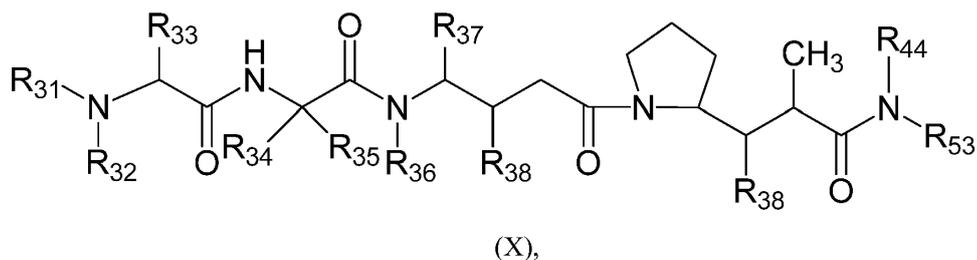
en donde:

a es un entero de 1 a 6;

c es un entero de 0 a 3; y

5 g es un entero de 2 a 6.

En otra realización la auristatina es un compuesto de Fórmula (X):



en donde:

cada uno de R₃₁ y R₃₂ es independientemente hidrógeno o C₁₋₈ alquilo y como mucho uno de R₃₁ y R₃₂ es hidrógeno;

10 R₃₃ es hidrógeno, C₁₋₈ alquilo, carbociclo C₃₋₈, arilo C₆₋₁₀, C₁₋₈ alquilo-arilo C₆₋₁₀, X¹-(carbociclo C₃₋₈), heterociclo C₃₋₈ o X¹-(heterociclo C₃₋₈);

R₃₄ es hidrógeno, C₁₋₈ alquilo, carbociclo C₃₋₈, arilo C₆₋₁₀, X¹-arilo, C₆₋₁₀ X¹-(carbociclo C₃₋₈), heterociclo C₃₋₈ o X¹-(heterociclo C₃₋₈);

R₃₅ es hidrógeno o metilo;

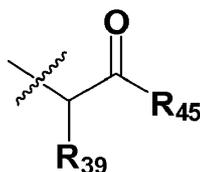
15 o R₃₄ y R₃₅, junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo carbocíclico que tiene la fórmula -(CR₅₅R₄₁)_b en donde cada uno de R₅₅ y R₄₁ es independientemente hidrógeno o C₁₋₈alquilo y b es un entero de 3 a 7;

R₃₆ es hidrógeno o C₁₋₈ alquilo;

R₃₇ es hidrógeno, C₁₋₈ alquilo, carbociclo C₃₋₈, arilo C₆₋₁₀, -X¹-arilo, C₆₋₁₀ -X¹-(carbociclo C₃₋₈), heterociclo C₃₋₈ o -X¹-(heterociclo C₃₋₈);

20 cada R₃₈ es independientemente hidrógeno, OH, C₁₋₈ alquilo, carbociclo C₃₋₈ o O-(C₁₋₈ alquilo);

R₅₃ es:



o R₅₄

R₃₉ es H, C₁₋₈ alquilo, arilo C₆₋₁₀, -X¹-arilo C₆₋₁₀, carbociclo C₃₋₈, heterociclo C₃₋₈, -X¹-heterociclo C₃₋₈, -alquileno C₁₋₈-NH₂, o (CH₂)₂SCH₃

cada X¹ es independientemente alquileno C₁₋₁₀ o cicloalquileno C₃₋₁₀;

R₄₄ es hidrógeno o C₁₋₈ alquilo;

5 R₄₅ es X³-R₄₂ o NH-R₁₉;

X³ es O o S;

R₁₉ es hidrógeno, OH, grupo amino, alquilamino o -[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂;

R₄₂ es un grupo amino, C₁₋₆ alquilamino o -[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂;

10 cada uno de R₂₀ y R₂₁ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, C₆₋₁₀ arilo C₆₋₁₀ hidroxilado, arilo C₆₋₁₀ polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C₃₋₈, cicloalquilo C₃₋₈ hidroxilado, cicloalquilo C₃₋₈ polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R₂₂ es -OH, -NHR₂₃, -COOH, -R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃), -R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(O CH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃) o -R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇;

cada R₂₃ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₈, -COOH, o -COO-alquilo-C₁₋₆;

15 X² es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R₇₇ es un hidrógeno o X² y NR₇₇ formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

R₈₂ es -NH u oxígeno;

R₅₄ es -C(R₅₆)₂--C(R₅₆)₂-arilo C₆₋₁₀, -C(R₅₆)₂--C(R₅₆)₂-heterociclo C₃₋₈ o -C(R₅₆)₂-C(R₅₆)₂-carbociclo C₃₋₈;

20 R₅₆ se selecciona independientemente de H, OH, C₁₋₈ alquilo, carbociclo C₃₋₈, -O-C₁₋₈ alquilo, -O-C(O)-R₂₉ y -O-R₂₃-O-alquilo-C₁₋₆-NH₂;

R₂₉ es un grupo amino, heterocicloalquilo de 5 a 12 miembros, -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-R₂₂, R₂₈-heterocicloalquilo C₃-C₁₂-alquilo C₁₋₆-R₂₂, -[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂, o -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-arilo C₆₋₁₂-alquilo-C₁₋₆-R₂₂; o R₂₉ es R₄₇ como se define aquí;

R₂₈ está ausente, NH u oxígeno;

a es un entero de 1 a 6;

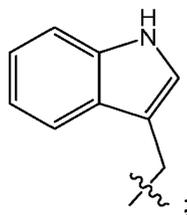
25 c es un entero de 0 a 3;

d es un entero de 1 a 3; y

f es un entero de 1 a 12.

En algunas realizaciones, en el compuesto auristatina de Fórmula (X):

R₃₉ es benzyl o

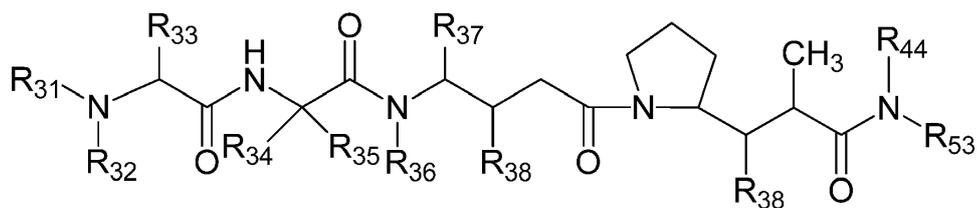


30

y

R₄₄ es hidrógeno.

En otra realización la auristatina es un compuesto de Fórmula (Xa):

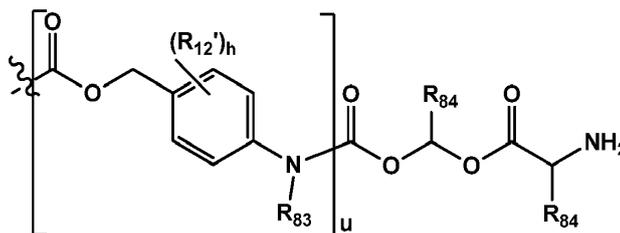


(Xa)

en donde:

R₃₃ hasta R₃₈, y R₄₄ son como se define aquí,

uno de R₃₁ y R₃₂ es hidrógeno o C₁₋₈ alquilo y el otro es:



5

en donde:

R₈₃ es hidrógeno o CH₃;

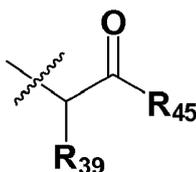
R₈₄ es C₁₋₆ alquilo o arilo C₆₋₁₀;

cada R_{12'} independientemente es halógeno, -C₁₋₈ alquilo, -O-C₁₋₈ alquilo, nitro o ciano;

10 h es un entero de 0 a 4; y

u es un entero 0 o 1;

R₅₃ es:



o R₅₄

15 R₃₉ es H, C₁₋₈ alquilo, arilo C₆₋₁₀, -X¹-arilo C₆₋₁₀, carbociclo C₃₋₈, heterociclo C₃₋₈, -X¹-heterociclo C₃₋₈, -alquileno C₁₋₈-NH₂, o (CH₂)₂SCH₃,

cada X¹ es independientemente alquileno C₁₋₁₀ o cicloalquileno C₃₋₁₀;

R₄₅ es X³-R₄₂ o NH-R₁₉;

X³ es O o S;

20 R₁₉ es hidrógeno, OH, grupo amino, alquilamino o -[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂;

R₄₂ es H, an amino group, C₁₋₆ alquilamino o -[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂;

cada uno de R₂₀ y R₂₁ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, C₆₋₁₀ arilo C₆₋₁₀ hidroxilado, arilo C₆₋₁₀ polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C₃₋₈, cicloalquilo C₃₋₈ hidroxilado, cicloalquilo C₃₋₈ polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

25 R₂₂ es -OH, -NHR₂₃, -COOH, -R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃), -R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(O CH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃) o -R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇;

cada R₂₃ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₈, -COOH, o -COO-alquilo-C₁₋₆;

X² es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R₇₇ es un hidrógeno o X² y NR₇₇ formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

R₈₂ es -NH u oxígeno;

R₅₄ es -C(R₅₆)₂--C(R₅₆)₂-arilo C₆₋₁₀, -C(R₅₆)₂--C(R₅₆)₂-heterociclo C₃₋₈ o -C(R₅₆)₂-C(R₅₆)₂-carbociclo C₃₋₈;

- 5 R₅₆ se selecciona independientemente de H, OH, C₁₋₈ alquilo, carbociclo C₃₋₈, -O-C₁₋₈ alquilo, -O-C(O)-R₂₉ y -O-R₂₃-O-alquilo-C₁₋₆-NH₂;

R₂₉ es un grupo amino, heterocicloalquilo de 5 a 12 miembros, -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-R₂₂, R₂₈-heterocicloalquilo C₃-C₁₂-alquilo C₁₋₆-R₂₂, -[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂, o -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-arilo C₆₋₁₂-alquilo-C₁₋₆-R₂₂; o R₂₉ es R₄₇ como se define aquí;

R₂₈ está ausente, NH u oxígeno;

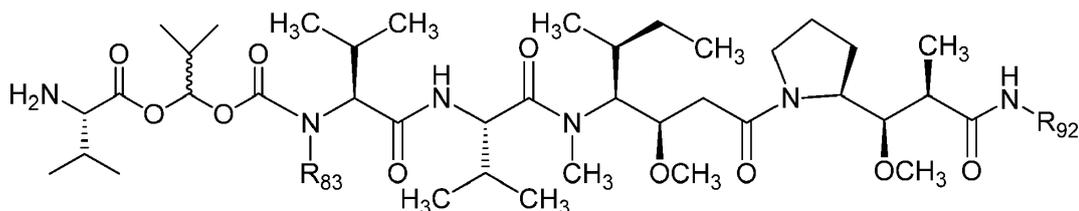
- 10 a es un entero de 1 a 6;

c es un entero de 0 a 3;

d es un entero de 1 a 3; y

f es un entero de 1 a 12.

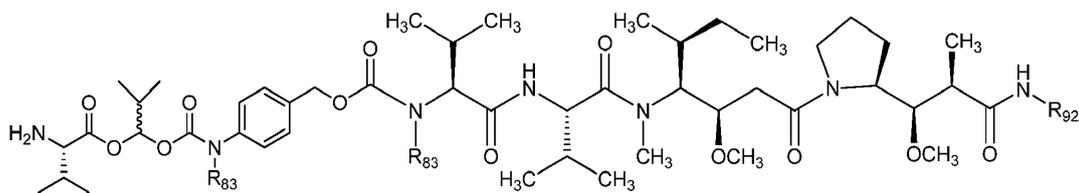
En una realización, el compuesto auristatina de Fórmula (Xa) es un compuesto de Fórmula (XIa) o Fórmula (XIb):



(XIa)

15

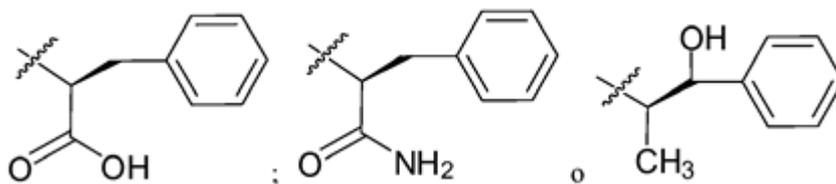
o



(XIb),

en donde:

R₉₂ es:



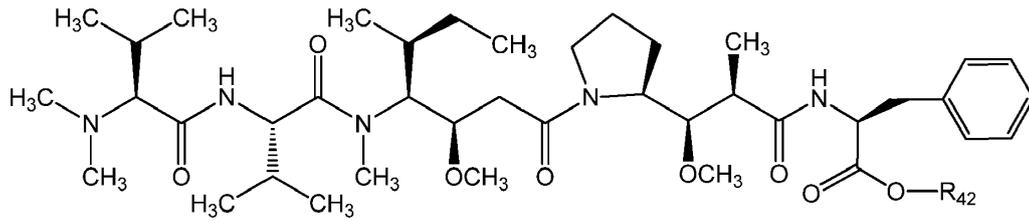
20

y

R₈₃ es hidrógeno o CH₃.

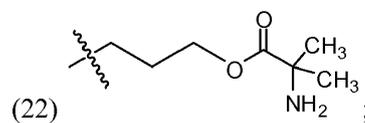
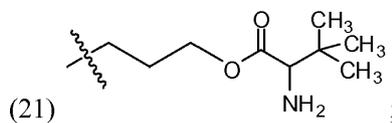
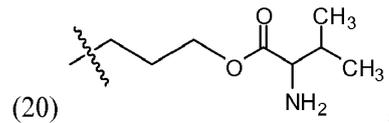
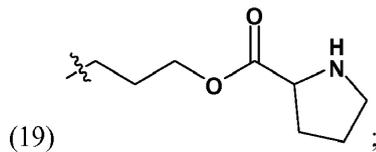
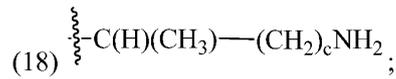
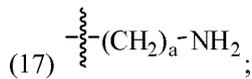
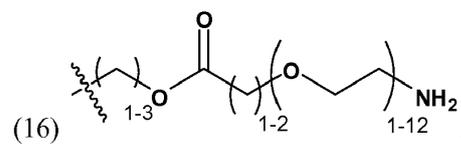
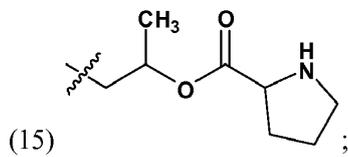
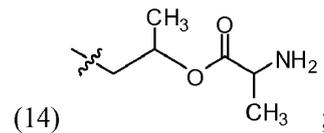
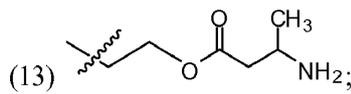
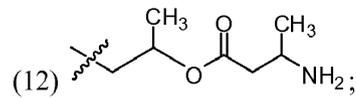
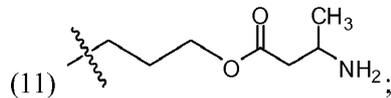
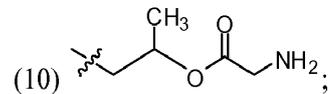
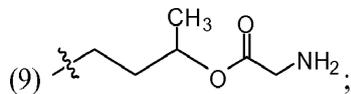
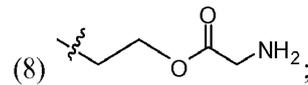
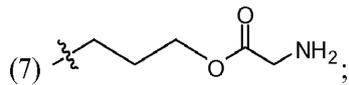
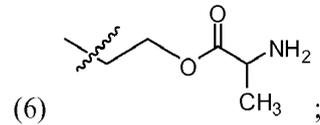
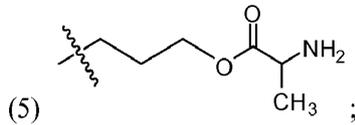
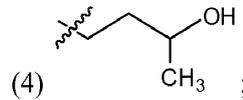
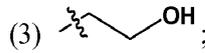
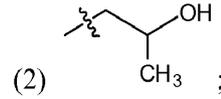
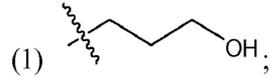
En una realización la auristatina de Fórmula (X) es un compuesto de Fórmula (XI), Fórmula (XII) o Fórmula (XIII):

en donde el compuesto de Fórmula (XI) es:



(XI)

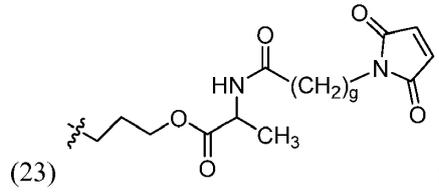
en donde R₄₂ es -CH₃ o una cualquiera de las siguientes estructuras:



5

10

y



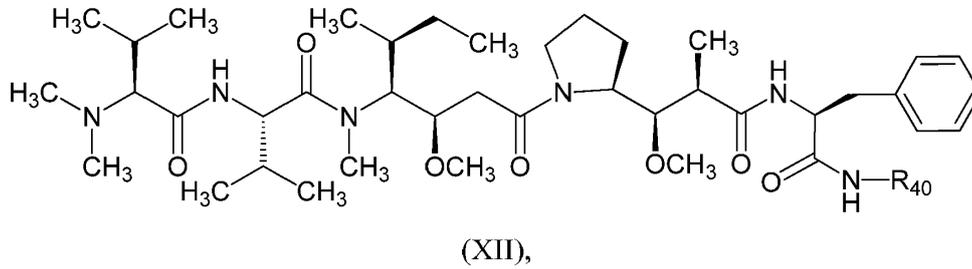
en donde:

a es un entero de 1 a 6;

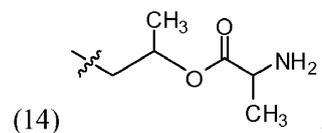
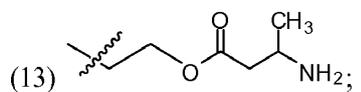
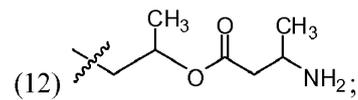
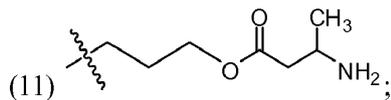
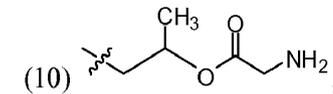
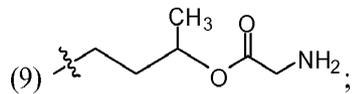
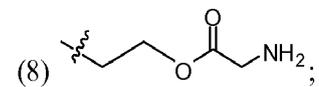
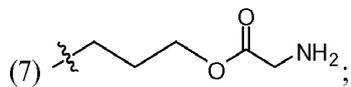
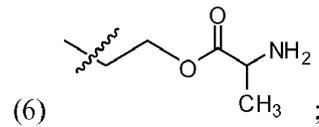
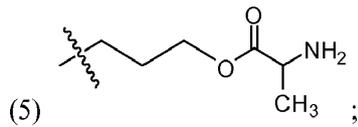
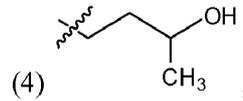
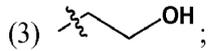
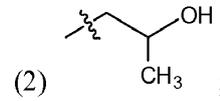
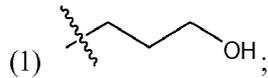
5 c es un entero de 0 a 3; y

g es un entero de 2 a 6;

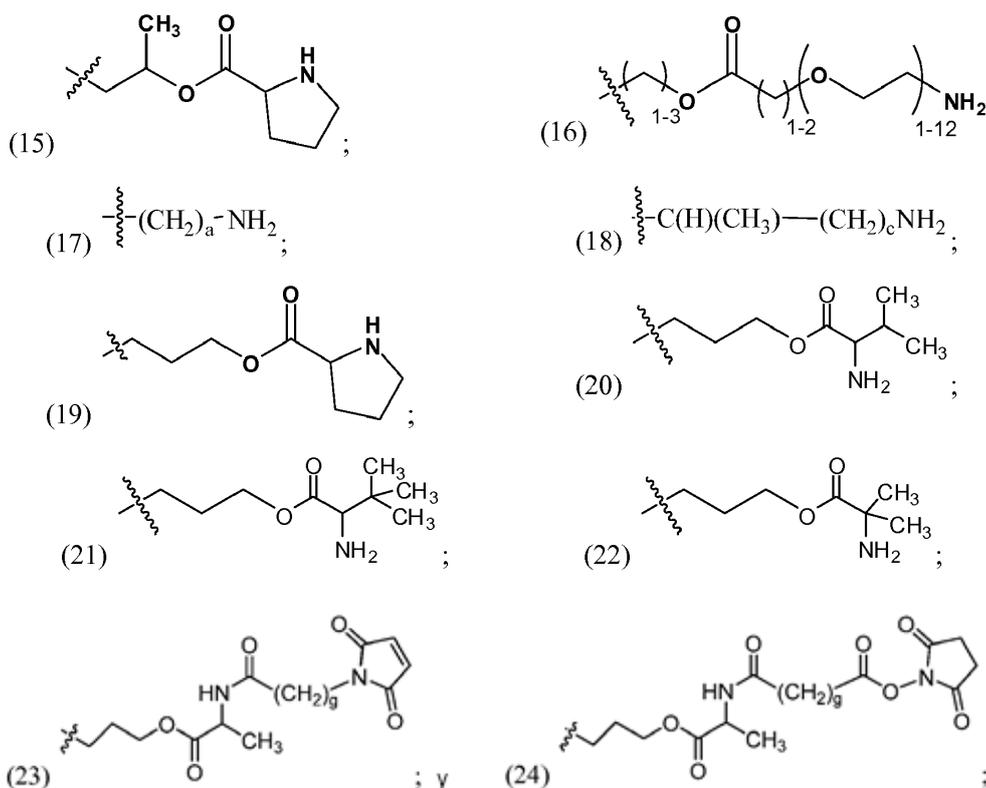
en donde el compuesto de Fórmula (XII) es:



10 en donde R₄₀ es hidrógeno, -OH, -NH₂, o cualquiera de las siguientes estructuras:



15



5

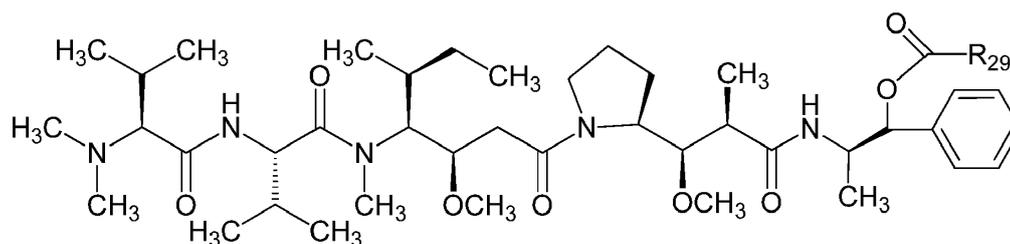
en donde:

a es un entero de 1 a 6;

g es un entero de 2 a 6; y

c es un entero de 0 a 3;

10 en donde el compuesto de Fórmula (XIII) es:



(XIII),

en donde R_{29} es un grupo amino, heterocicloalquilo de 5 a 12 miembros, $-R_{28}$ -alquilo- C_{1-6} - R_{22} , R_{28} -heterocicloalquilo C_{3-12} -alquilo C_{1-6} - R_{22} , $-R_{28}$ -[$C(R_{20}R_{21})$] $_a$ - R_{22} , o $-R_{28}$ -alquilo- C_{1-6} -arilo C_{6-12} -alquilo- C_{1-6} - R_{22} ; o R_{29} es R_{47} como se define aquí;

15 cada uno de R_{20} y R_{21} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, C_{6-10} arilo C_{6-10} hidroxilado, arilo C_{6-10} polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C_{3-8} , cicloalquilo C_{3-8} hidroxilado, cicloalquilo C_{3-8} polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R_{22} es $-OH$, $-NHR_{23}$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ o $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$;

20 cada R_{23} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-8} , $-COOH$, o $-COO$ -alquilo- C_{1-6} ;

X^2 es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R_{77} es un hidrógeno o X^2 y NR_{77} formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

R₈₂ es -NH u oxígeno;

R₂₈ está ausente, NH u oxígeno;

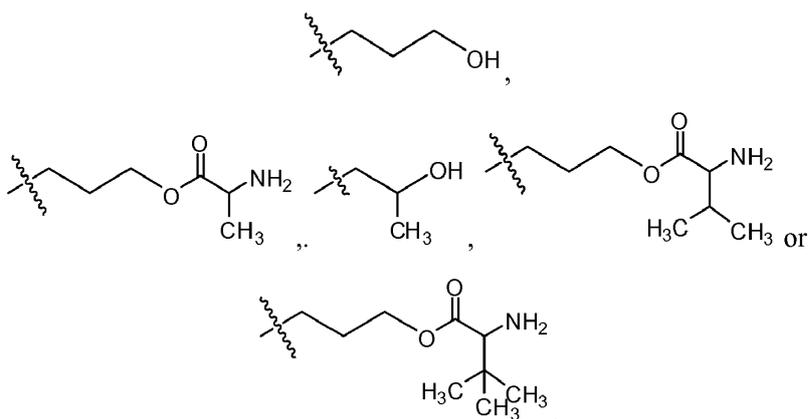
a es un entero de 1 a 6;

c es un entero de 0 a 3;

5 d es un entero de 1 a 3; y

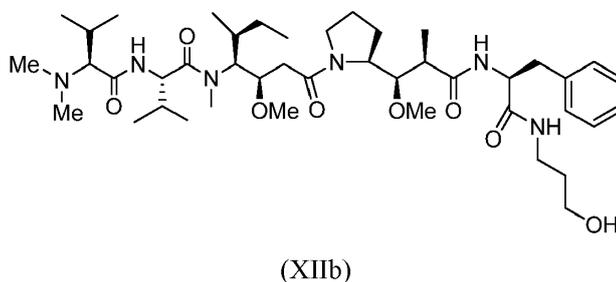
f es un entero de 1 a 12.

En una realización, en la Fórmula (XII), R₄₀ es

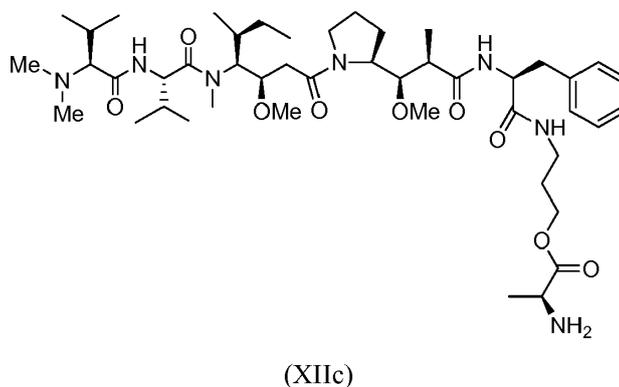


10

En otra realización, el compuesto de Fórmula (XII) es un compuesto de Fórmula (XIIb) o (XIIc):



o



15 En una realización en el compuesto de Fórmula (XIII), R₂₉ es -NH₂, heterocicloalquilo de 5 miembros, -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-R₂₂, R₂₈-hetero cicloalquilo C₅₋₁₂alquilo-C₁₋₆-R₂₂ o -R₂₈-alquilo-C₁₋₆-arilo C₆₋₁₂-alquilo-C₁₋₆-R₂₂; o R₂₉ es R₄₇ como se define aquí;

R₂₈ está ausente, NH u oxígeno;

20 R₂₂ es -OH, -NHR₂₃, -COOH, -R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃), -R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(O CH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃) o -R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇ ;

cada R_{23} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-8} , $-COOH$, o $-COO$ -alquilo- C_{1-6} ;

X^2 es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R_{77} es un hidrógeno o X^2 y NR_{77} formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

R_{82} es $-NH$ u oxígeno;

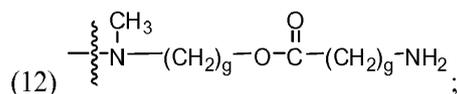
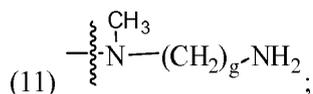
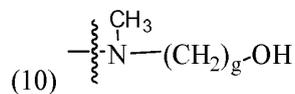
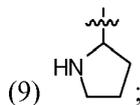
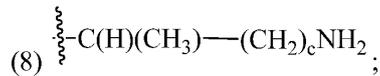
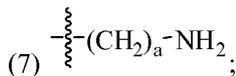
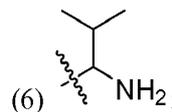
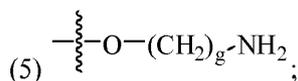
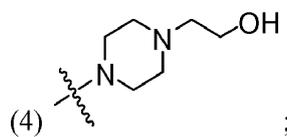
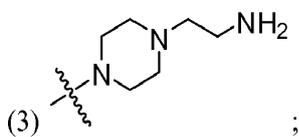
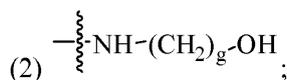
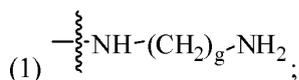
5 c es un entero de 0 a 3;

d es un entero de 1 a 3; y

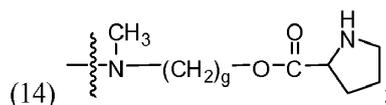
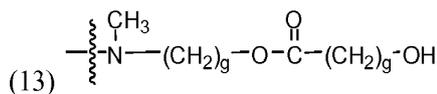
f es un entero de 1 a 12.

En aún otra realización, R_{29} es una cualquiera de las siguientes estructuras:

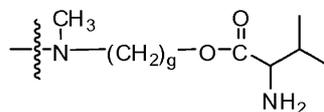
10



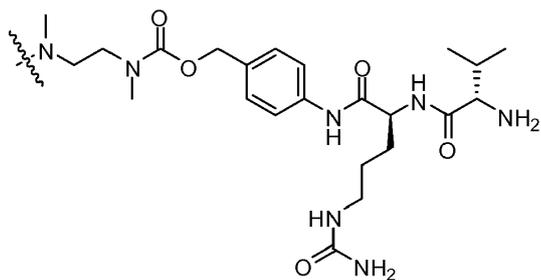
15



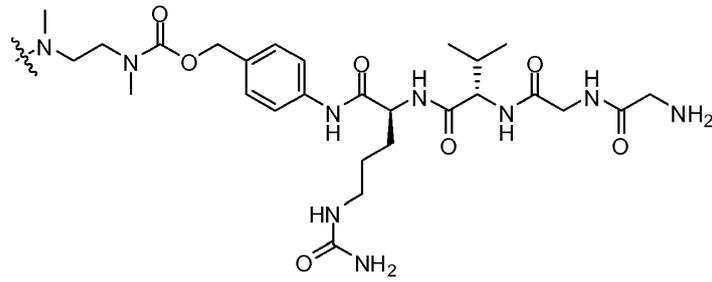
(15)



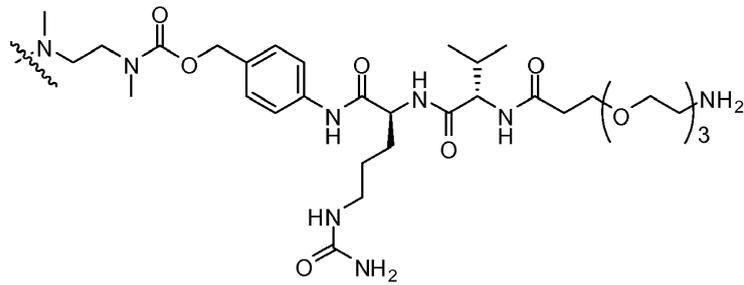
(16)



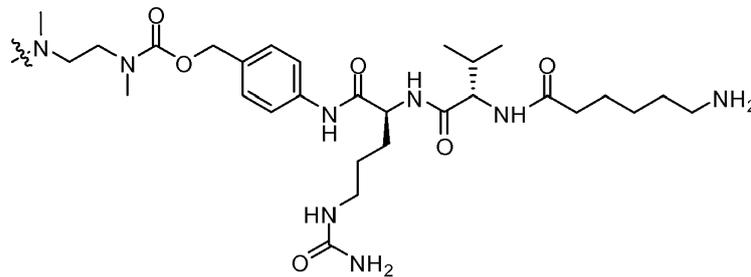
(17)



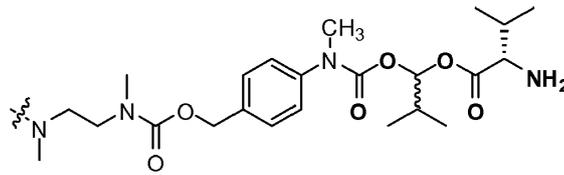
(18)



(19)

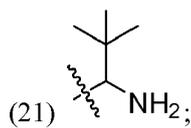


(20)



5

o



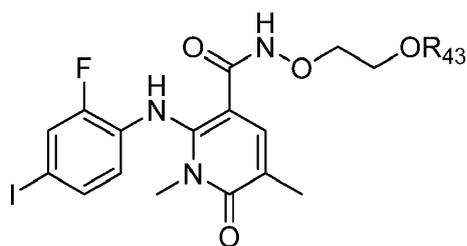
en donde:

a es un entero de 1 a 6;

10 c es un entero de 0 a 3; y

g es un entero de 2 a 6.

En una realización, el inhibidor de MEK es un compuesto de Fórmula (XIV):



(XIV)

en donde R_{43} es H o $-R_{46}-R_{47}$;

5 cada uno de R_{20} y R_{21} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, C_{6-10} arilo C_{6-10} hidroxilado, arilo C_{6-10} polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C_{3-8} , cicloalquilo C_{3-8} hidroxilado, cicloalquilo C_{3-8} polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R_{22} es $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ o $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$;

cada R_{23} es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-8} , $-COOH$, o $-COO$ -alquilo- C_{1-6} ;

X^2 es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

10 R_{77} es un hidrógeno o X^2 y NR_{77} formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

R_{82} es $-NH$ u oxígeno;

R_{46} es $-C(O)-$; $-C(O)-O-$, $-C(O)-NH-$, o está ausente;

R_{47} es como se define aquí;

a es un entero de 1 a 6;

15 c es un entero de 0 a 3;

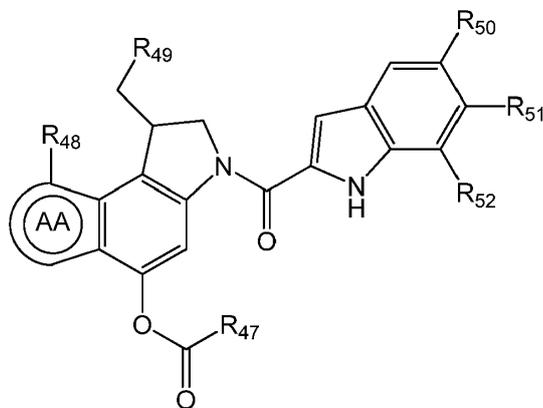
d es un entero de 1 a 3; y

f es un entero de 1 a 12.

Ejemplos adicionales del inhibidor de MEK se divulgan en el documento US 7,517,994 B2.

20 En algunas realizaciones R_{43} es $-C(O)-(CH_2)_a-NH_2$, o $-C(O)-C(H)(CH_3)-(CH_2)_c-NH_2$; en el que a es un entero de 1 a 6; y c es un entero de 0 a 3.

En otra realización, el compuesto duocarmicina es un compuesto de Fórmula (XV):



(XV),

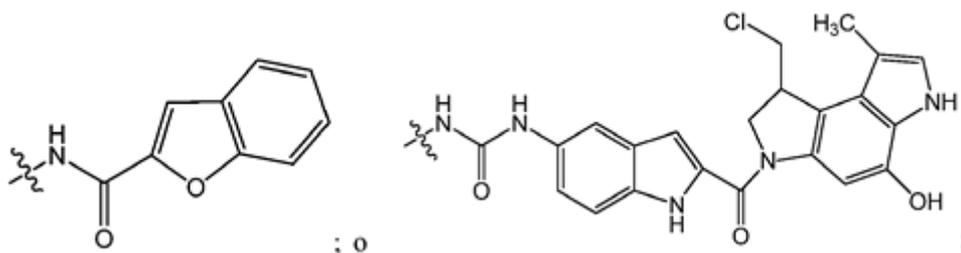
en donde:

R_{47} es como se define aquí;

R₄₈ es hidrógeno, -COOC₁₋₆ alquilo, -COOH, -NH₂ o -CH₃;

R₄₉ es Cl, Br o -OH;

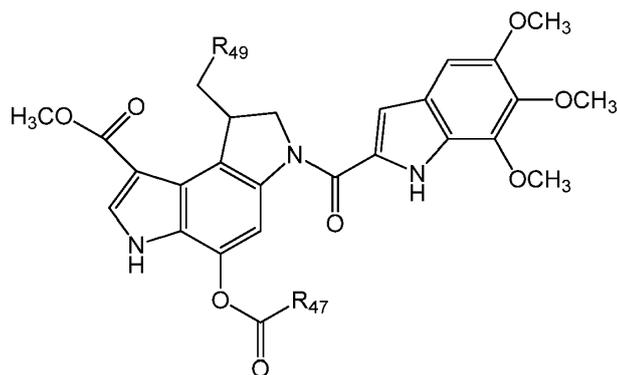
R₅₀ es hidrógeno, -OCH₃,



- 5 cada uno de R₅₁ y R₅₂ es independientemente hidrógeno o -OCH₃; y el anillo AA es un anillo de fenilo o pirrolilo.

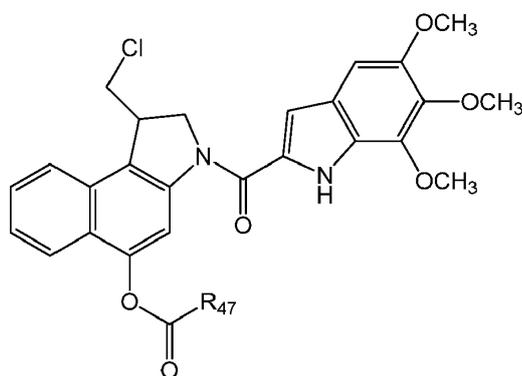
Ejemplos adicionales de compuestos duocarmicina se divulgan en el documento US 7,553,816.

En una realización el compuesto duocarmicina de Fórmula (XV) es un compuesto de Fórmula (XVI), (XVII), (XVIII) o (XIX):

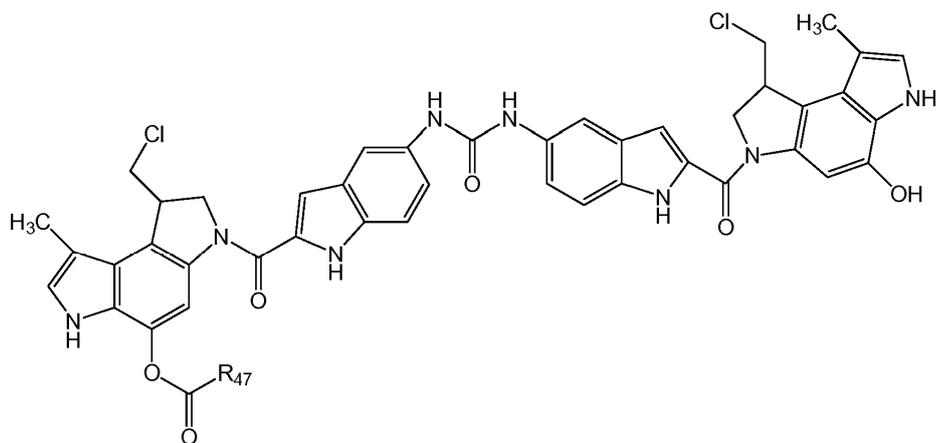


(XVI)

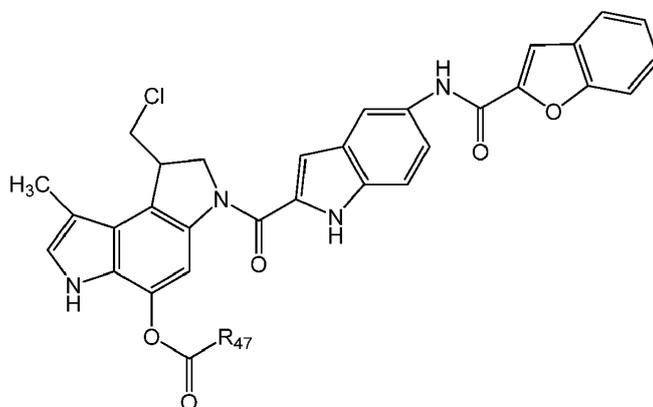
10



(XVII)



(XVIII)



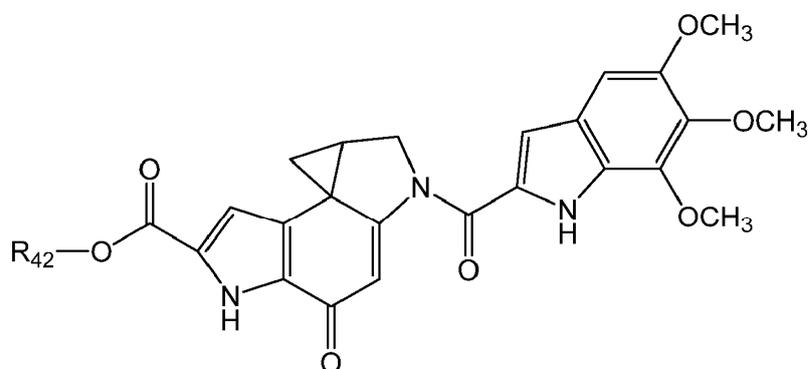
(XIX);

en donde:

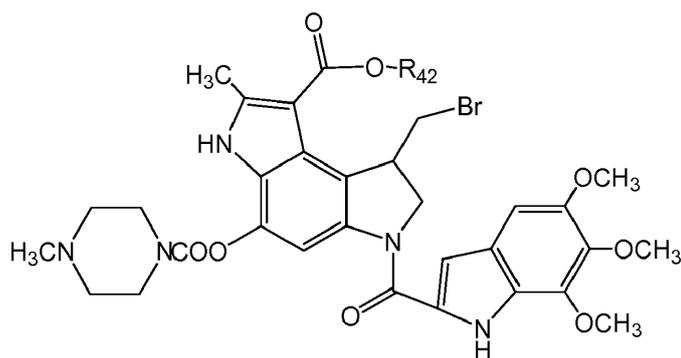
R₄₉ es Cl, Br o -OH; y

5 R₄₇ es como se define aquí.

En otra realización, el compuesto duocarmicina es un compuesto duocarmicina SA de Fórmula (XX): US 5101038; o (XXI):



(XX)



(XXI),

en donde:

R₄₂ es C₁₋₆ alquilamino o -[C(R₂₀R₂₁)]_a-R₂₂;

- 5 cada uno de R₂₀ y R₂₁ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, C₆₋₁₀ arilo C₆₋₁₀ hidroxilado, arilo C₆₋₁₀ polihidroxilado, heterociclo de 5 a 12 miembros, cicloalquilo C₃₋₈, cicloalquilo C₃₋₈ hidroxilado, cicloalquilo C₃₋₈ polihidroxilado o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R₂₂ es -OH, -NH₂, -COOH, -R₈₂-C(O)(CH₂)_c-C(H)(R₂₃)-N(H)(R₂₃), -R₈₂-C(O)(CH₂)_d-(O CH₂-CH₂)_f-N(H)(R₂₃), o -R₈₂-(C(O)-CH(X²)-NH)_d-R₇₇;

cada R₂₃ es independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₈, -COOH, o -COO-alquilo-C₁₋₆;

- 10 X² es una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural;

R₇₇ es un hidrógeno o X² y NR₇₇ formar un compuesto cíclico que contiene nitrógeno;

R₈₂ es -NH u oxígeno;

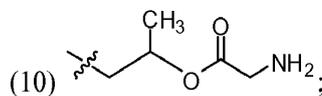
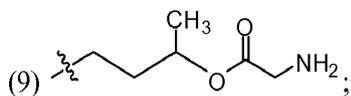
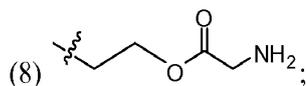
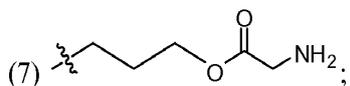
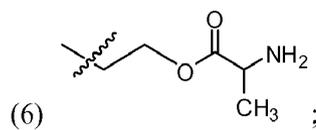
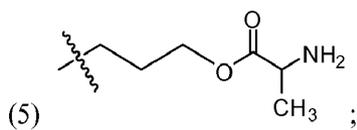
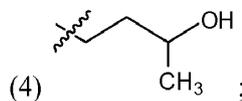
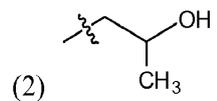
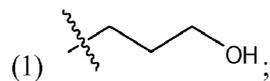
a es un entero de 1 a 6;

c es un entero de 0 a 3;

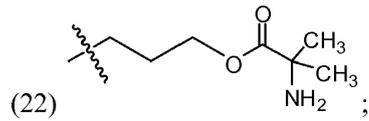
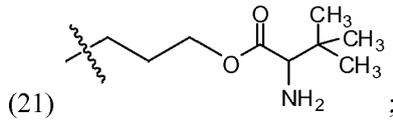
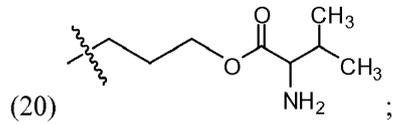
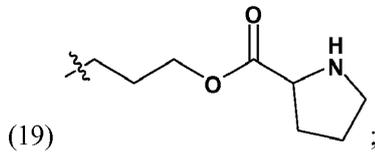
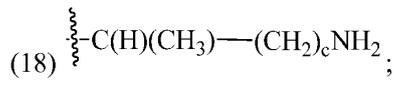
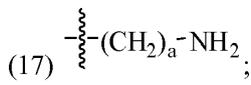
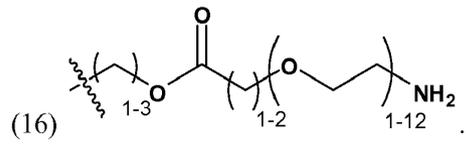
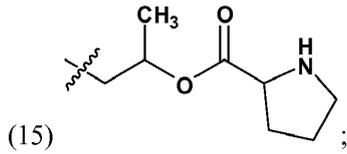
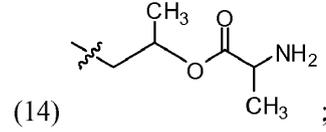
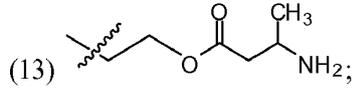
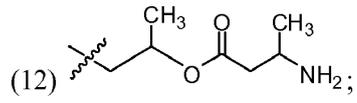
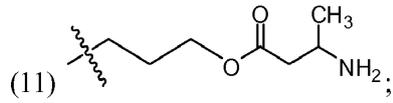
- 15 d es un entero de 1 a 3; y

f es un entero de 1 a 12.

En algunas realizaciones, R₄₂ es una cualquiera de las siguientes estructuras:

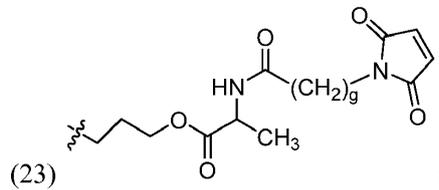


20



5

y



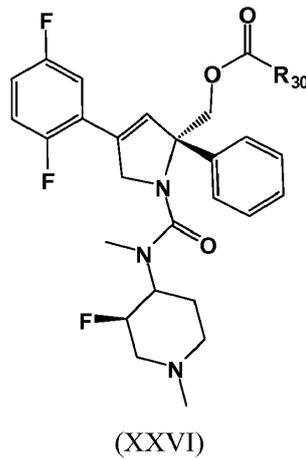
en donde:

10 a es un entero de 1 a 6;

g es un entero de 2 a 6; y

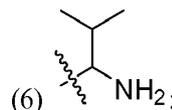
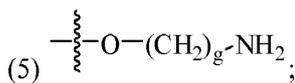
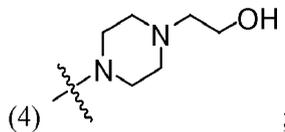
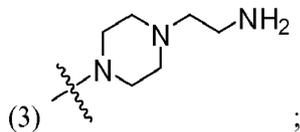
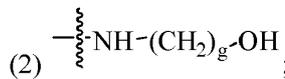
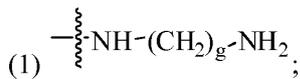
c es un entero de 0 a 3.

En otra realización, el compuesto inhibidor de KSP es un compuesto de Fórmula (XXVI):

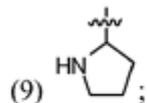
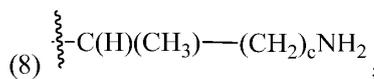
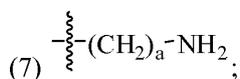


en donde R_{30} es como se define aquí.

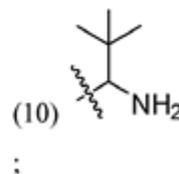
En algunas realizaciones R_{30} es:



5



o



en donde:

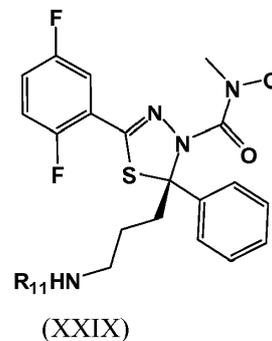
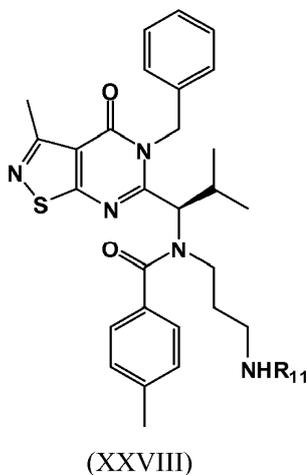
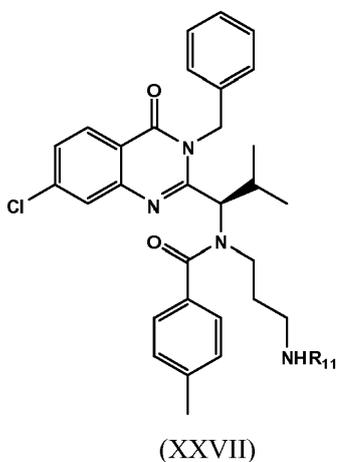
a es un entero de 1 a 6;

10 c es un entero de 0 a 3; y

g es un entero de 2 a 6.

En otra realización, el compuesto duocarmicina es Duocarmicina A, Duocarmicina B1, Duocarmicina B2, Duocarmicina C1, Duocarmicina C2, Duocarmicina D, CC-1065, Adozelesina, Bizelesina o Carzelesina

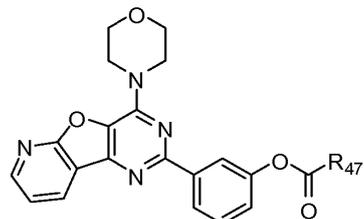
En otra realización, el compuesto inhibidor de KSP es un compuesto de Fórmula (XXVII), (XXVIII) o (XXIX):



15

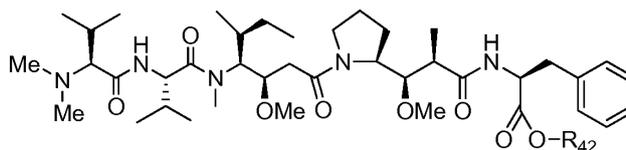
en donde:

R_{11} es como se define aquí.



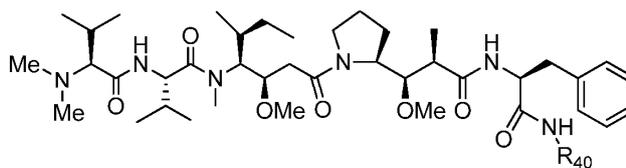
(IX)

R₄₇	m/z
	ND
	ND
	ND
	ND



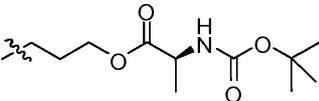
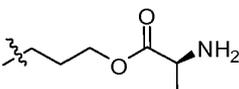
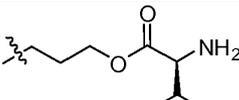
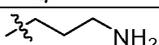
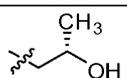
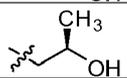
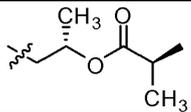
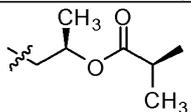
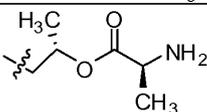
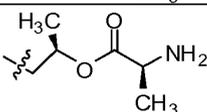
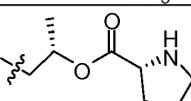
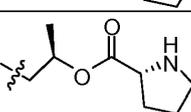
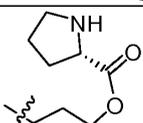
(XI)

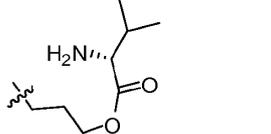
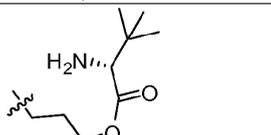
R₄₂	m/z
H	
-CH ₃	760
	802.6
	790
	804

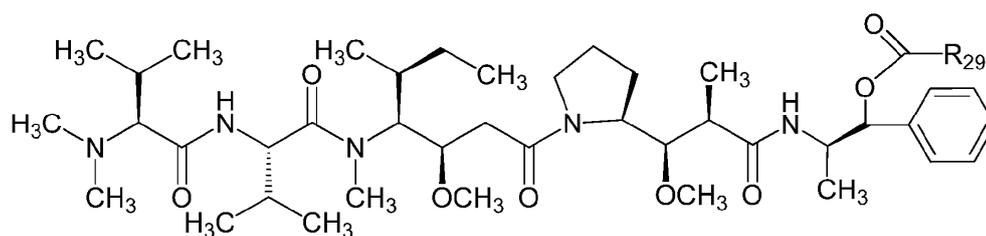


(XII)

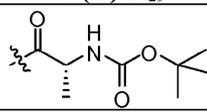
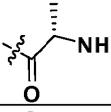
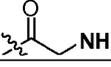
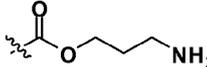
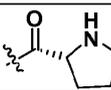
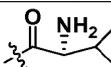
R₄₀	m/z
-H	
	803.5
	789.1

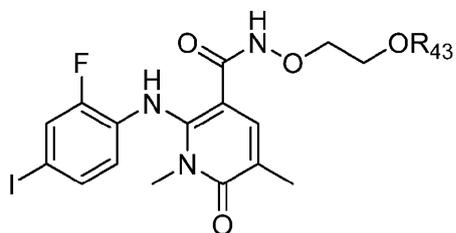
R₄₀	m/z
	974.2
	874.5
	902.2
	ND
	ND
-OH	788
	803.4
	803.4
	874.4
	874.4
	874.4
	874.4
	900.2
	900.2
	900.5

R₄₀	m/z
	900.5
	1016.6

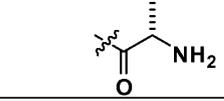
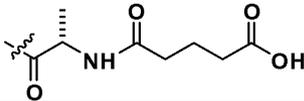


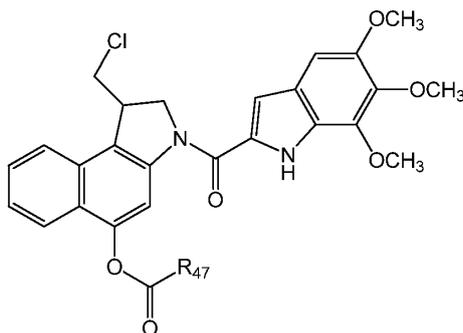
(XIII)

-C(O)-R₂₉	m/z
	903.2
	803.1
	790
	832.6
	829.1
	802

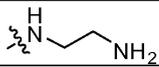
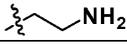
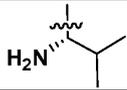
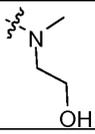
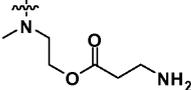
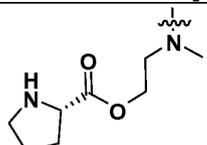


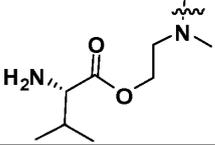
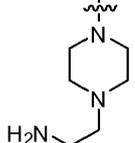
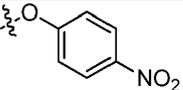
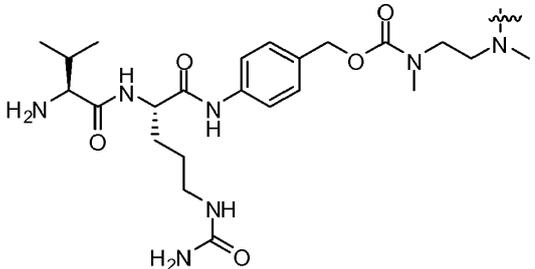
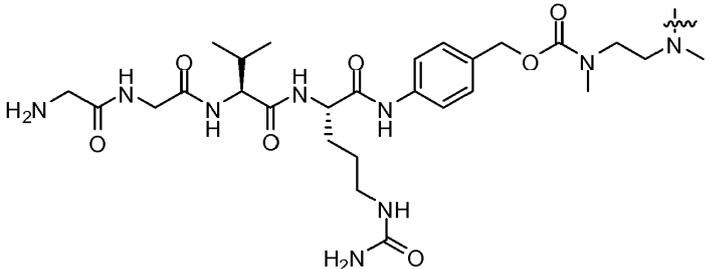
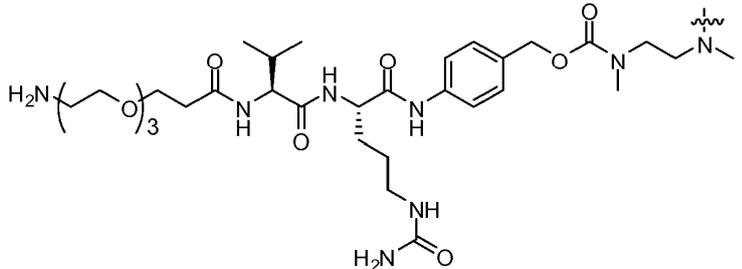
(XIV)

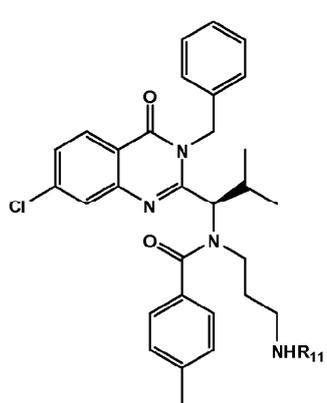
R₄₃	m/z
	ND
	644.9



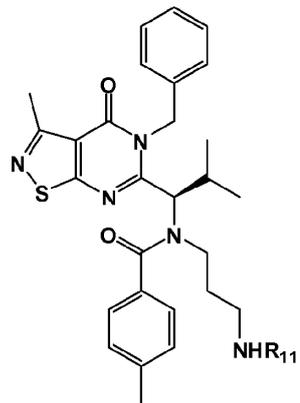
(XVII)

R₄₇	m/z
	553.1
	538.1
	564.1
	566.1
	568.1
	ND
	ND

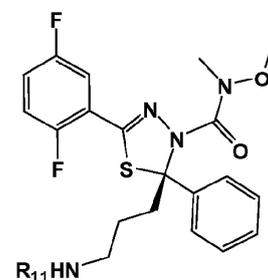
R₄₇	m/z
	667.2
	622.2
	632.02
	986.2
	ND
	ND



(XXVII)



(XXVIII)



(XXIX)

R ₁₁	m/z (XXVII)
	922.3
	732.2
	ND

R ₁₁	m/z (XXVII)
	ND
	ND
	ND

Moléculas de reconocimiento basadas en proteínas (PBRM)

- 5 La molécula de reconocimiento basada en proteínas dirige los conjugados portadores de fármaco-polímero a tejidos, células o ubicaciones específicos en una célula. La molécula de reconocimiento basada en proteínas puede dirigir el polímero modificado en cultivo o en un organismo entero, o ambos. En cada caso, la molécula de reconocimiento basada en proteínas tiene un ligando que está presente en la superficie celular de la (s) célula (s) objetivo (s) a las que se une con una especificidad, afinidad y avidez efectivas. En algunas disposiciones, la molécula de reconocimiento basada en proteínas dirige el polímero modificado a tejidos distintos del hígado. En otras disposiciones, la molécula de reconocimiento basada en proteínas direcciona el polímero modificado a un tejido específico tal como el hígado, riñón, pulmón o páncreas. La molécula de reconocimiento basada en proteínas puede direccionar el polímero modificado a una célula objetivo, tal como una célula cancerosa, tal como un receptor expresado en una célula, tal como una célula cancerosa, un tejido de matriz o una proteína asociada con un cáncer, tal como el antígeno tumoral. Alternativamente, las células que comprenden la vasculatura del tumor pueden ser direccionadas. Las moléculas de reconocimiento basadas en proteínas pueden dirigir el polímero a tipos específicos de células, tal como el direccionamiento específico a hepatocitos en el hígado, a diferencia de las células de Kupffer. En otros casos, las moléculas de reconocimiento basadas en proteínas pueden dirigir el polímero a células del sistema endotelial o linfático reticular, o a células fagocíticas profesionales, tales como macrófagos o eosinófilos. (En tales casos, el polímero en sí también podría ser un sistema de suministro efectivo, sin la necesidad de un direccionamiento específico).
- 10
- 15
- 20 En todavía otras disposiciones, la molécula de reconocimiento basada en proteínas puede direccionar el polímero modificado a una ubicación dentro de la célula, tal como el núcleo, el citoplasma o el endosoma, por ejemplo. En disposiciones específicas, la molécula de reconocimiento basada en proteínas puede potenciar la unión celular a los receptores, o el transporte citoplásmico al núcleo y la entrada o liberación nuclear de endosomas u otras vesículas intracelulares.
- 25 En realizaciones específicas, las moléculas de reconocimiento basadas en proteínas incluyen anticuerpos, proteínas y péptidos o miméticos de péptidos.
- En una realización preferida, la molécula de reconocimiento basada en proteínas comprende un grupo sulfhidrilo y la molécula de reconocimiento basada en proteínas se conjuga con el conjugado de polímero-fármaco formando un enlace covalente a través del grupo sulfhidrilo y un grupo funcional del polímero.

Anticuerpos previstos o anticuerpos derivados de Fab, Fab2, scFv o fragmentos de cadena pesada de anticuerpos de camello específicos para los marcadores de la superficie celular, incluyen, pero no se limitan a, 5T4, AOC3, ALK, AXL, C242, CA-125, CCL11, CCR 5, CD2, CD3, CD4, CD5, CD15, CA15-3, CD18, CD19, CA19-9, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD30, CD31, CD33, CD37, CD40, CD40, CD41, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD74, CD79-B, CD80, CD125, CD138, CD141, CD147, CD152, CD 154, CD326, CEA, factor de agrupamiento, CTLA-4, CXCR2, EGFR (HER1), ErbB2, ErbB3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, EPHB4, FGFR (es decir, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4), FLT3, receptor de folato, FAP, GD2, GD3, GPNMB, HGF, HG2, HER3, H.2, 2 ICOS-L, receptor de IGF-1, VEGFR1, EphA2, TRPV1, CFTR, gpNMB, CA9, Cripto, c-KIT, c-MET, ACE, APP, receptor adrenérgico beta2, Claudine 3, Mesotelina, MUC1, NaPi2b, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, RON, ROR1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-B4, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-13, integrinas (incluyendo integrinas α_4 , $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_1\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_{1b}\beta_3$), IFN- α , IFN- γ , IgE, IgE, receptor de IGF-1, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, receptor de interferón, ITGB2 (CD18), LFA-1 (CD11a), L-selectina (CD62L), mucina, MUC1, miostatina, NCA-90, NGF, PDGFR α , fosfatidilserina, células de carcinoma prostático, Pseudomonas aeruginosa, rabia, RANKL, virus sincitial respiratorio, factor Rhesus, SLAMF7, esfingosina-1-fosfato, TAG-72, receptor de células T, tenascina C, TGF-1, TGF- β , TNF- α , TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR2, vimentina y similares.

En una disposición, los anticuerpos o anticuerpos derivados de Fab, Fab2, scFv o fragmentos de cadena pesada de anticuerpos de camello específicos para los marcadores de superficie celular incluyen CA-125, C242, CD3, CD19, CD22, CD25, CD30, CD31, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD138, CD141, CD326, CEA, CTLA-4, EGFR (HER1), ErbB2, ErbB3, FAP, receptor de folato, receptor de IGF-1, GD3, GPNMB, HGF, HER2, VEGF-A, VEGFR2, VEGFR1, EphA2, EpCAM, 5T4, TAG-72, tenascina C, TRPV1, CFTR, gpNMB, CA9, Cripto, ACE, APP, PDGFR α , fosfatidilserina, carcinoma prostático, receptor adrenérgico-beta2, claudina 3, mucina, MUC1, Mesotelina, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-13 e integrinas (incluyendo integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_1\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$), tenascin C, TRAIL-R2 y vimentina.

Los anticuerpos previstos incluyen 3F8, abagovomab, abciximab (REOPRO), adalimumab (HUMIRA), adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, ALD518, alemtuzumab (CAMPATH), altumomab, amatuximab, anatumomab, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab (CEA-SCAN), aselizumab, atlizumab (tocilizumab, Actemra, RoActemra), atorolimumab, bapineuzumab, basiliximab (Simulect), bavituximab, bectumomab (LYMPHOSCAN), belimumab (BENLYSTA), benralizumab, bertilimumab, besilesomab (SCINITIMUN), bevacizumab (AVASTIN), biciromab (FIBRISCINT), bivatumumab, blinatumomab, brentuximab, briakinumab, canakinumab (ILARIS), cantuzumab, capromab, catumaxomab (REMOVAB), CC49, cedelizumab, certolizumab, cetuximab (ERBITUX), citatuzumab, cixutumumab, clenoliximab, clivatuzumab, conatumumab, CR6261, dacetuzumab, daclizumab (ZENAPAX), daratumumab, denosumab (PROLIA), detumomab, dorlimomab, dorlizumab, ecomeximab, eculizumab (SOLIRIS), edobacomab, edrecolomab (PANOREX), efalizumab (RAPTIVA), efungumab (MYCOGRAB), elotuzumab, elsilimomab, enlimomab, epitumomab, epratuzumab, erlizumab, ertumaxomab (REXOMUN), etaracizumab (ABEGRIN), exbivirumab, fanolesomab (NEUTROSPEC), faralimumab, farletuzumab, felvizumab, fezakinumab, figitumumab, fontolizumab (HuZAF), foravirumab, fresolimumab, galiximab, gantenerumab, gavilimomab, gemtuzumab, girentuximab, glembatumumab, golimumab (SIMPONI), gomiliximab, ibalizumab, ibritumomab, igovomab (INDIMACIS-125), inciromab (MYOSCINT), infliximab (REMICADE), intetumumab, inolimumab, inotuzumab, ipilimumab, iratumumab, keliximab, labetuzumab (CEA-CIDE), lebrizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, lintuzumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, matuzumab, mepolizumab (BOSATRIA), metelimomab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, morolimumab, motavizumab (NUMAX), muromonab-CD3 (ORTHOCLONE OKT3), nacolomab, naptumomab, natalizumab (TYSABRI), nebacumab, necitumumab, nerelimomab, nimotuzumab (THERACIM), nofetumomab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab (ARZERRA), olaratumab, omalizumab (XOLAIR), otecizumab, oportuzumab, oregovomab (OVAREX), otelizumab, pagibaximab, palivizumab (SYNAGIS), panitumumab (VECTIBIX), panobacumab, pascolizumab, pertumomab (THERAGYN), pertuzumab (OMNITARG), pexelizumab, pintumomab, priliximab, pritumomab, PRO 140, rafirivirumab, ramucirumab, ranibizumab (LUCENTIS), raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab (RITUXAN), robatumumab, rontalizumab, rovelizumab (LEUKARREST), ruplizumab (ANTOVA), satumomab pendetide, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, siplizumab, solanezumab, sonepcizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab (LEUKOSCAN), tacatumumab (AFP-CIDE), tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab (AUREXIS), telimomab, tenatumomab, teneliximab, teplizumab, TGN1412, ticilimumab (tremelimumab), tigatuzumab, TNX-650, tocilizumab (atlizumab, ACTEMRA), toralizumab, tosimumomab (BEXXAR), trastuzumab (HERCEPTIN), tremelimumab, tucotuzumab, tuvirumab, urtoxazumab, ustekinumab (STELERA), vopaliximab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimumab, visilizumab (NUVION), volociximab (HUMASPECT), votumumab, zalutumumab (HuMEX-EGFr), zanolimumab (HuMAX-CD4), ziralimumab y zolimomab.

En algunas disposiciones, los anticuerpos están dirigidos a marcadores de superficie celular para 5T4, CA-125, CEA, CD3, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD40, CD44, CD51, CTLA-4, EpCAM, HER2, EGFR (HER1), FAP, receptor de folato, HGF, integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de IGF-1, GD3, GPNMB, mucina, MUC1, fosfatidilserina, células de carcinoma prostático, PDGFR α , TAG-72, tenascin C, TRAIL-R2, VEGF-A y VEGFR2. En esta realización los anticuerpos son abagovomab, adecatumumab, alacizumab, altumomab, anatumomab, arcitumomab, bavituximab, bevacizumab (AVASTIN), bivatumumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, capromab,

5 cetuximab, citatumumab, clivatuzumab, conatumumab, dacetuzumab, edrecolomab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, figitumumab, gemtuzumab, glebatumumab, ibritumomab, igovomab, intetumumab, inotuzumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lucatumumab, matuzumab, mitumomab, naptumomab, estafenatox, necitumumab, oportuzumab, oregovomab, panitumumab, pentumomab, pertuzumab, primumab, rituximab (RITUXAN), rilatumumab, robatumumab, satumomab, sibrotuzumab, taplitumomab, tenatumomab, tenatumomab, ticilimumab (tremelimumab), tigatuzumab, trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab, tremelimumab, tucotuzumab, celmoleukin, volociximab y zalutumumab.

10 En disposiciones específicas, los anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie celular para HER2 son pertuzumab o trastuzumab y para EGFR (HER1) el anticuerpo es cetuximab o panitumumab; y para CD20 el anticuerpo es rituximab y para VEGF-A es bevacizumab y para CD-22 el anticuerpo es epratuzumab o veltuzumab y para CEA el anticuerpo es labetuzumab.

15 Los péptidos previstos adicionales o miméticos peptídicos de ejemplo incluyen péptidos de direccionamiento a la integrina (péptidos RGD), péptidos de direccionamiento al receptor de LHRH, péptidos de direccionamiento al receptor ErbB2 (HER2), péptidos de direccionamiento al antígeno unido a la membrana específica de la próstata (PSMA), direccionamiento de LRP1 del receptor de lipoproteína, péptidos derivados de la proteína ApoE, péptidos de proteína ApoA, péptidos de direccionamiento al receptor de somatostatina, péptidos derivados de clorotoxina, y bombesina.

En disposiciones específicas, los péptidos o miméticos de péptidos son péptidos de direccionamiento al receptor de LHRH y péptidos de direccionamiento al receptor de ErbB2 (HER2)

20 Las proteínas previstas comprenden insulina, transferrina, fragmento de fibrinógeno-gamma, trombospondina, claudina, apolipoproteína E, moléculas de Affibody tales como, por ejemplo, ABY-025, proteínas de repetición de Ankyrin, proteínas de repetición de tipo Ankyrin y péptidos sintéticos.

25 En algunas disposiciones de la invención, los conjugados de proteína-polímero-fármaco comprenden citotoxinas de amplio espectro en combinación con marcadores de superficie celular para HER2, tales como pertuzumab o trastuzumab; para EGFR tal como cetuximab y panitumumab; para CEA tal como labetuzumab; para CD20 tal como rituximab; para VEGF-A tal como bevacizumab; o para CD-22 tal como epratuzumab o veltuzumab.

30 En otras disposiciones de la invención, los conjugados de proteína-fármaco-polímero o conjugados de proteína-polímero usados comprenden combinaciones de dos o más moléculas de reconocimiento basadas en proteínas, tales como, por ejemplo, combinación de anticuerpos biespecíficos dirigidos al receptor de EGF (EGFR) en células tumorales y en CD3 y CD28 en células T; combinación de anticuerpos o anticuerpos derivados de Fab, Fab2, scFv o fragmentos de cadena pesada de anticuerpos de camello y péptidos o miméticos de péptidos; combinación de anticuerpos o anticuerpos derivados de Fab, Fab2, scFv o proteínas y fragmentos de cadena pesada de anticuerpos de camello; combinación de dos anticuerpos biespecíficos tales como los anticuerpos biespecíficos CD3 x CD19 más CD28 x CD22.

35 En otras disposiciones, los conjugados de proteína-fármaco-polímero o conjugados de proteína-polímero usados comprenden que las moléculas de reconocimiento basadas en proteínas son anticuerpos contra antígenos, tales como, por ejemplo, Trastuzumab, Cetuximab, Rituximab, Bevacizumab, Epratuzumab, Veltuzumab, Labetuzumab, B7-H4, B7-H3, CA125, CD33, CXCR2, EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, HER2, NaPi2b, c-Met, NOCH1, NOCH2, NOCH3, NOCH4, PD-L1, c-Kit, MUC1 y 5T4.

40 En la invención, los conjugados de proteína-fármaco-polímero o conjugados de proteína-polímero de la invención comprenden moléculas de reconocimiento basadas en proteínas que son anticuerpos contra 5T4, tales como, por ejemplo, un anticuerpo humanizado anti-5T4 scFvFc.

45 Ejemplos de ligandos o inmunoglobulinas direccionados a 5T4 adecuados incluyen aquellos que están disponibles comercialmente, o que se han descrito en la patente o en literatura no de patente, por ejemplo, US 8,044,178, US 8,309,094, US 7,514,546, EP1036091 (disponible comercialmente como TroVax™, Oxford Biomedica), EP2368914A1, WO 2013041687 A1 (Amgen), US 2010/0173382, y P. Sapra, et al., Mol. Cancer Ther. 2013, 12:38-47. Se divulga un anticuerpo anti-5T4 en la Solicitud Provisional U.S. No. 61/877,439, presentada el 13 de septiembre de 2013, y en la Solicitud Provisional U.S., Número 61/835.858, presentada el 17 de junio de 2013.

50 Como se usa en el presente documento, el término "porción de unión al antígeno 5T4" se refiere a una secuencia polipeptídica capaz de unirse selectivamente a un antígeno 5T4. En conjugados de ejemplo, la porción de unión al antígeno 5T4 generalmente comprende una forma de cadena simple scFv-Fc diseñada a partir de un anticuerpo anti-5T4. Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv-Fc) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de una inmunoglobulina, conectada con un péptido enlazador, y además conectada a una región Fc que comprende una la región bisagra y las regiones CH2 y CH3 de un anticuerpo (cualquiera de estas combinaciones de porciones de anticuerpo entre sí o con otras secuencias peptídicas se denomina a veces en el presente documento como una molécula de "inmunofusión"). Dentro de tal molécula scFvFc, la sección scFv puede estar enlazada terminalmente a C al terminal N de la sección Fc por un péptido enlazador.

55

Al menos una porción de la porción de unión al antígeno 5T4 de las moléculas de inmunofusión puede originarse a partir de una fuente murina. Por ejemplo, se puede obtener una molécula de inmunofusión expresando un polinucleótido modificado genéticamente para codificar al menos una región scFv anti-5T4 murina que tiene la secuencia polipeptídica de acuerdo con la SEQ ID NO: A (véase, por ejemplo, el número de solicitud provisional U.S. 61/835,858, presentado el 17 de junio de 2013). Adicionalmente, al menos una porción de la porción de unión al antígeno 5T4 puede generarse para ser quimérica o humanizada de acuerdo con métodos bien conocidos. Véase, Borrás et al., J. Biol. Chem. 2010 19 de marzo; 285 (12): 9054-66. Por lo tanto, se puede obtener una molécula de inmunofusión que tiene una porción de unión al antígeno 5T4 con una porción scFv humanizada mediante la expresión de un polinucleótido modificado genéticamente para codificar al menos la secuencia polipeptídica de acuerdo con la SEQ ID NO: B (véase, por ejemplo, el Número de Solicitud Provisional U.S. 61/835,858, presentada el 17 de junio de 2013).

En algunos ejemplos, la porción Fv de la porción de unión al antígeno 5T4 puede modificarse genéticamente mediante técnicas de biología molecular bien conocidas para comprender una o más sustituciones de aminoácidos en la región VH. La porción Fc de la porción de unión al antígeno 5T4 comprende preferiblemente una secuencia polipeptídica modificada genéticamente a partir de las regiones de bisagra, CH2 y CH3 humanas de un anticuerpo anti-5T4. Por ejemplo, es posible modificar genéticamente un polinucleótido para codificar al menos una porción Fc que tiene la secuencia polipeptídica de acuerdo con la SEQ ID NO: C (véase, por ejemplo, el número de solicitud provisional U.S. 61/835,858, presentado el 17 de junio de 2013).

Un polinucleótido que codifica un péptido en donde las regiones de cadena única Fv y Fc están unidas puede codificar al menos una porción quimérica de unión al antígeno 5T4 de conjugado que tiene la secuencia polipeptídica de acuerdo con la SEQ ID NO: D o puede codificar una porción de unión al antígeno 5T4 humanizado que tiene la secuencia polipeptídica de acuerdo con las SEQ ID NO: E o F.

Un enlazador polipeptídico, tal como uno que tiene la secuencia polipeptídica ASTC (SEQ ID NO: Y) o ASTX (SEQ ID NO: Z) (donde "X" se refiere a cualquier aminoácido o un enlace peptídico directo entre los aminoácidos adyacentes), puede fusionar el terminal C de la porción ScFv con el terminal N de la porción Fc de la porción de unión al antígeno 5T4. Por lo tanto, es posible modificar genéticamente un polinucleótido para codificar al menos un enlazador que tenga la secuencia polipeptídica de acuerdo con las SEQ ID NO: Y o Z. Si bien la SEQ ID NO: Y o Z puede usarse como un enlazador, una molécula de inmunofusión que tiene un enlazador peptídico de acuerdo con la SEQ ID NO: Y se beneficia de la conjugación específica del sitio debido a la presencia del residuo de cisteína.

Preferiblemente, cualquier sustitución, inserción, eliminación o uso de aminoácidos de un peptidomimético no reduce sustancialmente la afinidad o especificidad de la porción de unión al antígeno 5T4. Una molécula de inmunofusión que tiene una sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos o un peptidomimético en la porción de unión al antígeno 5T4 retiene preferiblemente más del 75%, preferiblemente más del 80%, preferiblemente más del 85%, preferiblemente más del 90%, o preferiblemente más del 95% de afinidad o especificidad para unirse al antígeno 5T4 en comparación con un conjugado con una porción de unión al antígeno 5T4 no modificada.

La proteína de fusión de anticuerpo de cadena sencilla anti-5T4 ("anti-5T4 scFv-Fc") se preparó en células CHO DG44, como se divulga en la Solicitud Provisional U.S. Número 61/835,858, presentada el 17 de junio de 2013.

SEQ ID N°: A: scFv murino específico de 5T4:

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVWKQSPGKGLEWIGRINPNNGVTLYN
 QKFKDKATLTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTSTVTVSSG
 GGGSGGGGSGGGGSSIVMTQTPTSLLSAGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLL
 ISYTSSRYAGVPRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDAAYVFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK

40 SEQ ID NO: B: scFv humanizado específico de 5T4:

EVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCKASGYSFTGYMHVWRQAPGKGLEWVSRINPNNGVTLTY
 NQKFKDRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGLTVTVSS
 GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVDRVTITCKASQSVSN
 DVAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSRYAGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDYN
 SPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: C: Bisagra humana CH2-CH3 (Fcgamma1):

EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: Y: conjugación específica de sitio-1: ASTC

SEQ ID NO: Z: sin conjugación específica de sitio-1: ASTX

SEQ ID NO: D: scFv-Fc anti-5T4 quimérico:

5 EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSPGKGLEWIGRINPNNGVTLYN
 QKFKDKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTSVTVSSG
 GGGSGGGSGGGSSIVMTQTPTSLLSAGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLL
 ISYTSRYAGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDAAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKAST
 CEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: E: scFv-Fc anti-5T4 humanizado (ASTC):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSFTGYMHVVRQAPGKGLEWVSRINPNNGVTLTY
 NQKFKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGLTVTVSS
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVDRVTITCKASQSVSN
 DVAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSRYAGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDYN
 SPPTFGGGTKLEIKASTCEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

SEQ ID NO: F: scFv-Fc anti-5T4 humanizado (ASTX):

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYSFTGYMHVVRQAPGKGLEWVSRINPNNGVTLTY
 NQKFKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGLTVTVSS
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVDRVTITCKASQSVSN
 DVAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSRYAGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDYN
 SPPTFGGGTKLEIKASTXEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

15 Estos anticuerpos pueden producirse de forma recombinante, sintéticamente o por otro método adecuado conocido en la técnica. Tales métodos y constructos utilizan las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos y las secuencias peptídicas identificadas en el presente documento. Alternativamente, tales métodos y constructos para la producción de anticuerpos utilizan secuencias que se modifican de manera natural o artificialmente, por ejemplo, variantes naturales o variantes optimizadas de codones de las SEQ ID NO proporcionadas en este documento (por ejemplo, A). Se conoce en la técnica una variedad de esquemas de optimización de codones. Véase, por ejemplo,

UpGene™ y Optimizer™, que son métodos de optimización basados en la web. Además, varias instituciones comerciales realizan la optimización de codones utilizando un esquema de propiedad privada, por ejemplo, SignGen Laboratories, DNA2.0, OpenX, entre otros.

5 Estos ligandos de direccionamiento, los enlazadores y los fragmentos de fármaco o profármaco descritos en el presente documento pueden ensamblarse en el fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la invención, por ejemplo, de acuerdo con las técnicas y métodos divulgados. Los conjugados terapéuticos y direccionados de la invención, y los métodos para producirlos, se describen a continuación a modo de ejemplo no limitativo.

Conjugados o armazones poliméricos

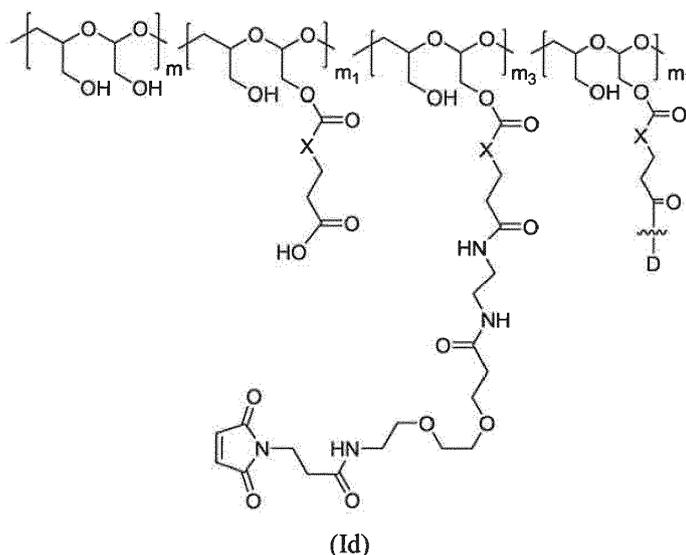
10 Los conjugados de la invención comprenden una o más apariciones de D, donde D es un agente terapéutico, por ejemplo, un fármaco, en el que la una o más apariciones de D pueden ser iguales o diferentes.

En ciertas otras realizaciones, una o más apariciones de PBRM están unidas al portador polimérico, en el que las una o más apariciones de PBRM pueden ser iguales o diferentes. En ciertas otras realizaciones, uno o más portadores poliméricos que contienen una o más apariciones de D están conectados a una PBRM (por ejemplo, un anticuerpo).

15 Como se discutió más generalmente antes, en ciertas realizaciones, cada portador polimérico tiene independientemente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 25% de monómeros que comprenden una D, más preferiblemente de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 20%, más preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 10%. Por ejemplo, el portador polimérico es PHF que tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa y tiene aproximadamente 0.3% a aproximadamente 15% de monómeros que comprenden auristatina F, más preferiblemente aproximadamente 2% -12%, más preferiblemente aproximadamente 5% -10%.

20 En ciertas realizaciones, cuando D es un fármaco que tiene una IC₅₀ <10 pM para la actividad antiproliferativa en un amplio rango de líneas celulares, el portador polimérico es PHF que tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa y tiene aproximadamente 0,1% a aproximadamente 25% de monómeros que comprenden D, más preferiblemente aproximadamente 2% -10%, más preferiblemente aproximadamente 2% -5%.

En ciertas realizaciones, el conjugado de esta invención es de Fórmula (Id):



en donde

en donde:

30 cada presencia de D es independientemente un agente terapéutico que tiene un peso molecular de ≤ 5 kDa, y la



entre D y el grupo carbonilo denota la unión directa o indirecta de D al grupo carbonilo,

m₁ es un entero de 1 a aproximadamente 140, y

m_7 es un entero de 1 a aproximadamente 40, en donde la suma de m_1 y m_7 es m_6 (es decir, 2 a aproximadamente 180).

En una realización, D es a) un compuesto de auristatina; (b) un compuesto de caliqueamicina; (c) un compuesto duocarmicina; (d) un inhibidor de topoisomerasa, (e) un compuesto de pirrolobenzodiazepina; (f) un compuesto de vinca; (g) un inhibidor de la síntesis de proteínas; (h) un inhibidor de la ARN polimerasa; (i) un compuesto de unión a tubulina; o un análogo de los mismos.

5

En cierta realización, D es (a) un compuesto de auristatina; (b) un compuesto de caliqueamicina; (c) un compuesto duocarmicina; (d) un compuesto de camptotecina, (e) un compuesto de pirrolobenzodiazepina; (f) un compuesto de vinca; o un análogo de los mismos.

Por ejemplo, el compuesto de auristatina es auristatina, dolastatina, monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF), auristatina F, AF HPA, fenilendiamina (AFP).

10

Por ejemplo, la duocarmicina o un análogo de la misma es duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA, CC-1065, adozelesina, bizelesina o carzelesina.

Por ejemplo, el compuesto de camptotecina es camptotecina, CPT-11 (irinotecan), SN-38 o topotecan.

15

Por ejemplo, el compuesto de pirrolobenzodiazepina es un monómero de pirrolobenzodiazepina, un dímero de pirrolobenzodiazepina simétrico o un dímero de pirrolobenzodiazepina no simétrico.

El conjugado de polímero-fármaco de Fórmula (Id) es útil para la conjugación con una PBRM que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor; 80 kDa o mayor; 100 kDa o mayor; 120 kDa o mayor 140 kDa o más; 160 kDa o más; 180 kDa o más; o 200 kDa o más, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60 -140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa o 100-140 kDa).

20

Por ejemplo, para conjuguar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa o más (por ejemplo, 60 kDa o más, 80 kDa o más, 100 kDa o más, 120 kDa o más, 140 kDa o más, 160 kDa o más kDa o mayor), el portador polimérico del almacén de la invención es un poliacetal, por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2- 20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa).

25

Por ejemplo, para conjuguar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa a 200 kDa, el portador polimérico del almacén de la invención es un poliacetal, por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa).

30

Por ejemplo, para conjuguar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa a 80 kDa, el portador polimérico del almacén de la invención es un poliacetal, por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa). Por ejemplo, el PHF tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, 10 kDa o 15 kDa.

35

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpos, tales como, por ejemplo, Fabs.

Por ejemplo, para conjuguar una PBRM que tiene un peso molecular de 60 kDa a 120 kDa, el portador polimérico del almacén de la invención es un poliacetal, por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa). Por ejemplo, el PHF tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, 10 kDa o 15 kDa.

40

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, camélidos, Fab2, scFvFc, y similares.

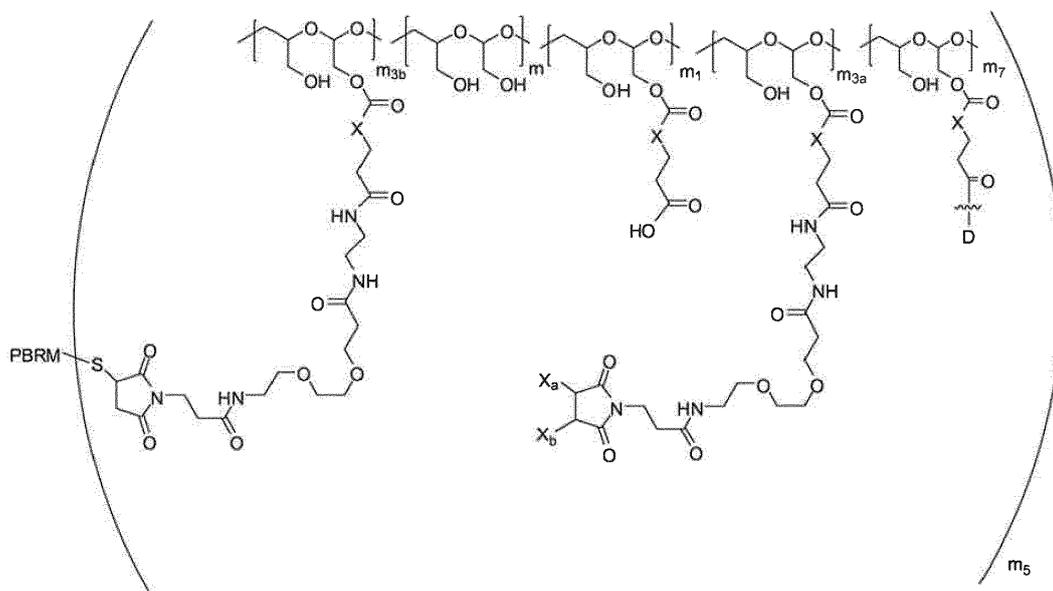
Por ejemplo, para conjuguar una PBRM que tiene un peso molecular de 140 kDa a 180 kDa, el portador polimérico del almacén de la invención es un poliacetal, por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa). Por ejemplo, el PHF tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, 10 kDa o 15 kDa.

45

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, tales como, IgG, IgM.

50

En ciertas realizaciones, el conjugado de fármaco polimérico (Id) cuando se conjuga con una PBRM es de Fórmula (Ie):



(Ie),

en donde:

uno de X_a y X_b es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido, o X_a y X_b , junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un doble enlace carbono-carbono;

5 m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 17,

m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8, en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es m_3 ,

la suma de m , m_1 , m_7 , m_{3a} , y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300, y

m_5 es un entero de 1 a aproximadamente 10.

10 La PBRM tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor; 80 kDa o mayor; 100 kDa o mayor; 120 kDa o mayor; 140 kDa o mayor; 160 kDa o mayor; 180 kDa o mayor; o 200 kDa o más, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60-140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa, o 100-140 kDa).

15 Por ejemplo, la PBRM tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o más (por ejemplo, 60 kDa o más; 80 kDa o más; 100 kDa o más; 120 kDa o más; 140 kDa o más; 160 kDa o más; 180 kDa o mayor; o 200 kDa o mayor, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60-140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa, o 100-140 kDa) y tiene un grupo sulfhidrilo (es decir, -SH o tiol).

Por ejemplo, el número total de enlaces de sulfuro formados entre el PHF y la PBRM (o el número total de puntos de unión) es 10 o menos.

Por ejemplo, la relación entre m_7 y m_{3b} es mayor que 1:1 y menor que o igual 10:1.

20 Por ejemplo, la relación entre m_7 y m_{3b} es aproximadamente 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

Por ejemplo, la relación entre m_7 y m_{3b} está entre 2:1 y 8:1.

Por ejemplo, la relación entre m_7 y m_{3b} es aproximadamente 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

Por ejemplo, la relación entre m_7 y m_{3b} está entre 2:1 y 4:1.

Por ejemplo, la relación entre m_7 y m_{3b} es aproximadamente 4:1, 3:1, o 2:1.

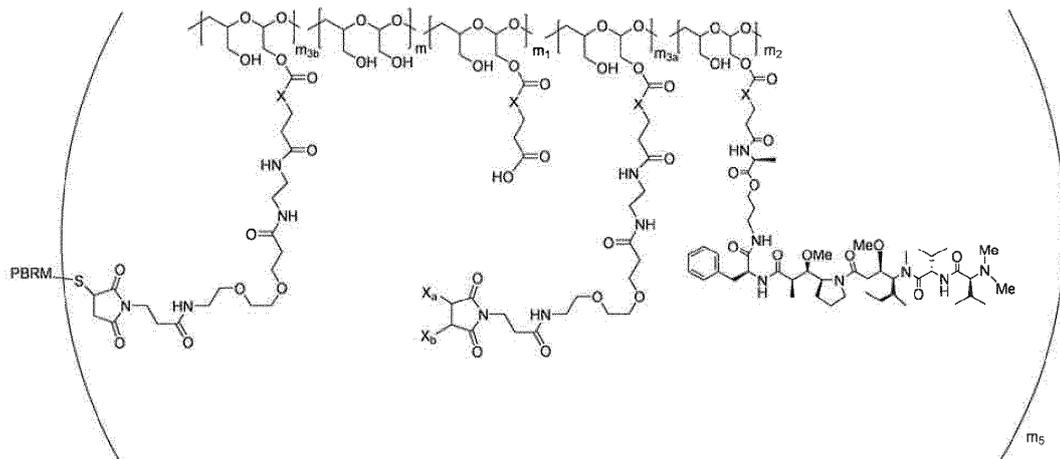
25 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ie) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa, la suma de m , m_1 , m_7 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 150, m_1 es un entero de 1 a aproximadamente 70, m_7 es un entero de 1 a aproximadamente 20, m_{3a} es un entero de 0 a 9, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 8.

30 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ie) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa, la suma de m , m_1 , m_7 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 110,

m_1 es un entero de 2 a aproximadamente 50, m_7 es un entero de 2 a aproximadamente 15, m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 7, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 4.

5 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ie) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, la suma de m , m_1 , m_7 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75, m_1 es un entero de aproximadamente 5 a aproximadamente 35, m_7 es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 4, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 5 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 4.

En ciertas realizaciones, el conjugado de proteína-polímero-fármaco de esta invención es de Fórmula (Ib) como se describe aquí:



10 (Ib).

en donde:

uno de X_a y X_b es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido, o X_a y X_b , junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un doble enlace carbono-carbono,;

m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 17,

15 m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8, en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es m_3 ,

la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300, y

m_5 es un entero de 1 a aproximadamente 10.

20 Por ejemplo, la PBRM tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor; 80 kDa o mayor; 100 kDa o mayor; 120 kDa o mayor; 140 kDa o mayor; 160 kDa o mayor; 180 kDa o mayor; o 200 kDa o mayor, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60-140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa, o 100-140 kDa).

Por ejemplo, el número total de enlaces de sulfuro formados entre el PHF y la PBRM (o el número total de puntos de unión) es 10 o menos.

Por ejemplo, la relación entre m_2 y m_{3b} es mayor que 1:1 y menor que o igual 10:1.

25 Por ejemplo, la relación entre m_2 y m_{3b} es aproximadamente 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

Por ejemplo, la relación entre m_2 y m_{3b} está entre 2:1 y 8:1.

Por ejemplo, la relación entre m_2 y m_{3b} es aproximadamente 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, o 2:1.

Por ejemplo, la relación entre m_2 y m_{3b} está entre 2:1 y 4:1.

Por ejemplo, la relación entre m_2 y m_{3b} es aproximadamente 4:1, 3:1, o 2:1.

30 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ib) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 150, m_1 es un entero de 1 a aproximadamente 70, m_2 es un entero de 1 a aproximadamente 20, m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 9, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 8.

Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ib) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a 15 kDa, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} varía de 20 a 110, m_1 es un entero de 2 a 50, m_2 es un entero de 2 a 15, m_{3a} es un entero de 0 a 7, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 8 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 4.

5 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ib) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75, m_1 es un entero de aproximadamente 5 a aproximadamente 35, m_2 es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, m_{3a} es un entero de 0 a aproximadamente 4, m_{3b} es un entero de 1 a aproximadamente 5 y m_5 es un entero de 2 a aproximadamente 4.

10 Por ejemplo, las unidades estructurales bloqueadoras de maleimido son unidades estructurales que pueden unirse covalentemente a uno de los dos átomos de carbono de olefina tras la reacción del grupo maleimido con un compuesto que contiene tiol de Fórmula (II):



en donde:

R_{90} es NHR_{91} , OH, $COOR_{93}$, $CH(NHR_{91})COOR_{93}$ o un grupo fenilo sustituido;

15 R_{93} es hidrógeno o C_{1-4} alquilo;

R_{91} es hidrógeno, CH_3 o CH_3CO y

d es un entero de 1 a 3.

20 Por ejemplo, el compuesto bloqueador maleimido de Fórmula (II) puede ser cisteína, N-acetil cisteína, éster metílico de cisteína, N-metil cisteína, 2-mercaptoetanol, ácido 3-mercaptopropanoico, ácido 2-mercaptoacético, mercaptometanol (es decir, $HOCH_2SH$), bencil tiol en el que fenilo está sustituido con uno o más sustituyentes hidrófilos, o 3-aminopropano-1-tiol. El uno o más sustituyentes hidrófilos en fenilo comprenden OH, SH, metoxi, etoxi, $COOH$, CHO , CO alquilo C_{1-4} , NH_2 , F, ciano, SO_3H , PO_3H , y similares .

Por ejemplo, el grupo bloqueador de maleimido es $-S-(CH_2)_d-R_{90}$, en el que,

R_{90} es OH, $COOH$, o $CH(NHR_{91})COOR_{93}$;

25 R_{93} es hidrógeno o CH_3 ;

R_{91} es hidrógeno o CH_3CO ; y

d es 1 o 2.

Por ejemplo, el grupo bloqueador de maleimido es $-S-CH_2-CH(NH_2)COOH$.

30 Por ejemplo, cuando el PHF tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 40 kDa, (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa), el número de fármacos por PHF (por ejemplo, m_2) es un entero de 1 a aproximadamente 40, (por ejemplo, aproximadamente 1-20 o aproximadamente 2-15 o aproximadamente 3-10). Este armazón se puede usar, por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor; 80 kDa o mayor; o 100 kDa o mayor; 120 kDa o mayor; 140 kDa o mayor; 160 kDa o mayor o 180 kDa o mayor). En esta realización la relación de PBRM per PHF está entre

35 aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:9, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:8, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:7, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:4, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:3, entre

40 aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:4 o entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:3.

45 Por ejemplo, cuando el PHF tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 40 kDa, (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa), el número de fármacos por PHF (por ejemplo, m_2) es un entero de 1 a aproximadamente 40, (por ejemplo, aproximadamente 1:20 o aproximadamente 2-15 o aproximadamente 3:10). Este armazón se puede usar, por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 140 kDa a 180 kDa. En esta realización la relación de PBRM per PHF está entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:9, entre aproximadamente 1:1 y

50 aproximadamente 1:8, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:7, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:4, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:3, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:2 y

aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:4 o entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:3.

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, tales como, IgG, IgM.

- 5 Por ejemplo, cuando el PHF tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 40 kDa, (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa), el número de fármacos por PHF (por ejemplo, m_2) es un entero de 1 a aproximadamente 40, (por ejemplo, aproximadamente 1:20 o aproximadamente 2:15 o aproximadamente 3:10). Este armazón se puede usar, por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso
- 10 aproximadamente 60 kDa a 120 kDa. En esta realización la relación de PBRM per PHF está entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:9, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:8, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:7, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:4, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:3, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:4 o entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:3.

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos tales como, por ejemplo, Fab2, scFv y camélidos.

- 20 Por ejemplo, cuando el PHF tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 40 kDa, (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa), el número de fármacos por PHF (por ejemplo, m_2) es un entero de 1 a aproximadamente 40, (por ejemplo, aproximadamente 1:20 o aproximadamente 2-15 o aproximadamente 3:10). Este armazón se puede usar, por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa a 80 kDa. En esta realización la relación de PBRM per PHF está entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:9, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:8, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:7, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:4, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:3, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:6, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:5, entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:4 o entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:3.

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos, tales como, Fabs.

- 35 También se describe en este documento un armazón polimérico útil para conjugar tanto con una molécula de reconocimiento basada en proteínas (PBRM) como con un agente terapéutico (D). El armazón libre de D comprende un portador polimérico, uno o más enlazadores conectados al portador polimérico que es adecuado para conectar una PBRM al portador polimérico, y uno o más enlazadores adecuados para conectar un fármaco (D) al portador polimérico.

- 40 En ciertos métodos, los conjugados se forman en varias etapas. Estas etapas incluyen (1) modificar un polímero para que contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional del fármaco o su derivado; (2) hacer reaccionar el polímero modificado con el fármaco o su derivado de modo que el fármaco esté unido al polímero; (3) modificar el conjugado de polímero-fármaco para que el polímero contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional de la PBRM o su derivado; y (4) hacer reaccionar el conjugado de polímero-fármaco modificado con la PBRM o su derivado para formar el conjugado de esta invención. La etapa (3) se puede omitir si el polímero modificado producido por la etapa (1) contiene un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo funcional de la PBRM o su derivado.

- 45 En otro método, los conjugados se forman en varias etapas: (1) modificando un polímero para que contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional de un primer fármaco o su derivado; (2) hacer reaccionar el polímero modificado con el primer fármaco o su derivado de manera que el primer fármaco esté unido al polímero; (3) modificar el conjugado de polímero-fármaco para que contenga un grupo funcional diferente que pueda reaccionar con un grupo funcional de un segundo fármaco o su derivado (4) haciendo reaccionar el conjugado de polímero-fármaco modificado con el segundo fármaco o su derivado de manera que el segundo fármaco esté unido al conjugado de polímero-fármaco; (5) modificar el conjugado de polímero-fármaco que contiene 2 fármacos diferentes para que el polímero contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional de la PBRM o su derivado; y (6) hacer reaccionar el conjugado de polímero-fármaco modificado de la etapa (5) con la PBRM o su derivado para formar el conjugado de esta invención. Las etapas (5) y (6) se pueden repetir si 2 PBRM diferentes o sus derivados se deben conjugar para formar un conjugado de polímero-fármaco que comprende dos fármacos diferentes y dos PBRM diferentes.

5 En aún otro método, los conjugados se forman en varias etapas. Estas etapas incluyen (1) modificar un polímero para que contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional del fármaco o su derivado; (2) modificar además el polímero para que también contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional de la PBRM o su derivado; (3) hacer reaccionar el polímero modificado con el fármaco o su derivado de modo que el fármaco esté unido al polímero; y (4) hacer reaccionar el conjugado de polímero-fármaco modificado con la PBRM o su derivado para formar el conjugado de esta invención. La secuencia de las etapas (1) y (2) o la de las etapas (3) y (4) se puede invertir. Además, cualquiera de las etapas (1) o (2) se puede omitir si el polímero modificado contiene un grupo funcional que puede reaccionar tanto con un grupo funcional del fármaco o sus derivados como con un grupo funcional de la PBRM o su derivado.

10 En otro método, los conjugados se forman en varias etapas: (1) modificando un polímero para que contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional de un primer fármaco o su derivado; (2) modificando adicionalmente un polímero para que contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional de la PBRM o su derivado; (3) haciendo reaccionar el polímero modificado con el primer fármaco o su derivado de modo que el primer fármaco esté unido al polímero; (4) modificando el conjugado de polímero-fármaco para que contenga un grupo funcional diferente que pueda reaccionar con un grupo funcional de un segundo fármaco o su derivado (5) haciendo reaccionar el conjugado de polímero-fármaco modificado con el segundo fármaco o su derivado de manera que el segundo fármaco está unido al conjugado de polímero-fármaco; (6) haciendo reaccionar el conjugado de polímero-fármaco modificado que contiene 2 fármacos diferentes de modo que el polímero con la PBRM o su derivado forme el conjugado de esta invención. La etapa (6) se puede repetir si 2 PBRM diferentes o sus derivados se deben
20 conjugar para formar un conjugado de polímero-fármaco que comprende dos fármacos diferentes y dos PBRM diferentes. La etapa (4) se puede llevar a cabo después de la etapa (1) de manera que el polímero modificado contenga dos grupos funcionales diferentes que puedan reaccionar con dos fármacos diferentes o sus derivados. En este método, el polímero modificado que contiene dos grupos funcionales diferentes que pueden reaccionar con dos fármacos diferentes o sus derivados puede modificarse además para que contenga un grupo funcional que pueda reaccionar con un grupo funcional de la PBRM o su derivado; antes de la reacción del polímero modificado con los dos fármacos diferentes (etapa (3) y etapa (5) o PBRM (etapa (6)).

Los conjugados biocompatibles biodegradables de la invención se pueden preparar para cumplir los requisitos deseados de biodegradabilidad e hidrofiliidad. Por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas, se puede alcanzar un equilibrio entre la biodegradabilidad y la estabilidad. Por ejemplo, se sabe que las moléculas con pesos moleculares más allá de un cierto umbral (generalmente, por encima de 40-100 kDa, dependiendo de la forma física de la molécula) no se excretan a través de los riñones, como son las moléculas pequeñas, y se pueden eliminar del cuerpo solo a través de la absorción por las células y la degradación en los compartimentos intracelulares, sobre todo lisosomas. Esta observación ejemplifica cómo se pueden diseñar materiales funcionalmente estables y biodegradables mediante la modulación de su estabilidad bajo condiciones fisiológicas generales ($\text{pH} = 7.5 \pm 0.5$) y con un pH lisosomal (pH cercano a 5). Por ejemplo, se sabe que la hidrólisis de los grupos acetal y cetal está catalizada por ácidos, por lo tanto, los poliales serán en general menos estables en el entorno lisosomal ácido que, por ejemplo, en el plasma sanguíneo. Se puede diseñar una prueba para comparar el perfil de degradación del polímero a, por ejemplo, $\text{pH} = 5$ y $\text{pH} = 7.5$ a 37°C en medios acuosos, y así determinar el equilibrio esperado de estabilidad del polímero en un entorno fisiológico normal y en el compartimento lisosomal "digestivo" después de la captación por las células. La integridad del polímero en tales pruebas se puede medir, por ejemplo, por HPLC de exclusión de tamaño. Un experto en la técnica puede seleccionar otros métodos adecuados para estudiar diversos fragmentos de los conjugados degradados de esta invención.

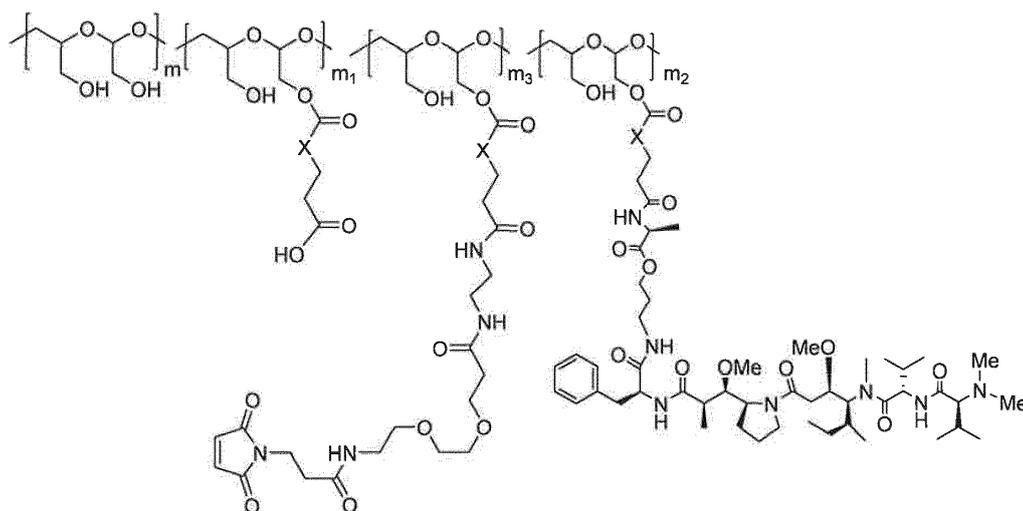
En muchos casos, será preferible que a $\text{pH} = 7.5$ el tamaño efectivo del polímero no cambie de manera detectable en 1 a 7 días, y permanezca dentro del 50% del original por al menos varias semanas. A un $\text{pH} = 5$, por otro lado, el polímero debería degradarse de manera detectable durante 1 a 5 días, y transformarse completamente en fragmentos de bajo peso molecular dentro de un marco de tiempo de dos semanas a varios meses. Aunque en algunos casos es preferible una degradación más rápida, en general puede ser más deseable que el polímero se degrade en las células con una tasa que no exceda la tasa de metabolización o excreción de los fragmentos de polímero por parte de las células. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se espera que los conjugados de la presente invención sean biodegradables, en particular tras la captación por las células, y relativamente "inertes" en relación con los sistemas biológicos. Los productos de degradación del portador están preferiblemente sin carga y no cambian significativamente el pH del ambiente. Se propone que la abundancia de grupos alcohol puede proporcionar una baja tasa de reconocimiento de polímeros por parte de los receptores celulares, en particular de los fagocitos. Los esqueletos poliméricos de la presente invención generalmente contienen pocos determinantes antigénicos, si es que tienen alguno, (características, por ejemplo, para algunos polisacáridos y polipéptidos) y generalmente no comprenden estructuras rígidas capaces de involucrarse en interacciones de tipo "llave y cerradura" en vivo a menos que estas últimas sean deseables. Por lo tanto, se predice que los conjugados solubles, entrecruzados y sólidos de esta invención tienen baja toxicidad y bioadhesividad, lo que los hace adecuados para varias aplicaciones biomédicas.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los conjugados biocompatibles biodegradables pueden formar estructuras lineales o ramificadas. Por ejemplo, los conjugados de poliales biocompatibles biodegradables de la presente invención pueden ser quirales (ópticamente activos). Opcionalmente, los conjugados de poliales biocompatibles biodegradables de la presente invención pueden ser escalémicos.

En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención son solubles en agua. En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención son insolubles en agua. En ciertas realizaciones, el conjugado de la invención está en forma sólida. En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención son coloides. En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención están en forma de partículas. En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención están en forma de gel.

5

Esta invención también presenta un armazón polimérico útil para conjugar con una PBRM para formar un conjugado de polímero-fármaco-PBRM descrito en el presente documento. El armazón comprende un portador polimérico de Fórmula (Ia) útil para conjugar con una molécula de reconocimiento basada en proteínas (PBRM), por ejemplo, PBRM con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o más:



(Ia),

10

el armazón comprende poli(1-hidroximetil-etil-hidroxi-metil-formal) (PHF) que tiene un peso molecular que varía desde aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa;

X es CH₂, O, o NH;

m es un entero de 1 a aproximadamente 300,

15 m_1 es un entero de 1 a aproximadamente 140,

m_2 es un entero de 1 a aproximadamente 40,

m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 18, y

la suma de m, m_1 , m_2 y m_3 varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300.

20 Por ejemplo, cada presencia de la unidad estructural maleimido en la unidad " m_3 " de Fórmula (Ia) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.

Por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa o mayor (por ejemplo, 60 kDa o mayor, 80 kDa o mayor, 100 kDa o mayor, 120 kDa o mayor, 140 kDa o mayor, 160 kDa o mayor o 180 kDa o mayor, o aproximadamente 40-200 kDa, 40-180 kDa, 40-140 kDa, 60-200 kDa, 60-180 kDa, 60-140 kDa, 80-200 kDa, 80-180 kDa, 80-140 kDa, 100-200 kDa, 100-180 kDa, o 100-140 kDa), el portador polimérico del armazón de la invención es un poli-acetal., por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa).

25

Por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa a 200 kDa, el portador polimérico del armazón de la invención es un poli-acetal., por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa).

30

Por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 40 kDa a 80 kDa, el portador polimérico del armazón de la invención es un poli-acetal., por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa). Por ejemplo El PHF tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, 8 kDa, 10 kDa, 13 kDa o 15 kDa.

35

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos, tales como, for example, Fabs.

- 5 Por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 60 kDa a 120 kDa, el portador polimérico del armazón de la invención es un poliacetal., por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 5-30 kDa, aproximadamente 5-20 kDa o aproximadamente 5-15 kDa o aproximadamente 5 - 10kDa). Por ejemplo El PHF tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa.

Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, camélidos, Fab2, scFcFv, y similares.

- 10 Por ejemplo, para conjugar una PBRM que tiene un peso molecular de 140 kDa a 180 kDa, el portador polimérico del armazón de la invención es un poliacetal., por ejemplo, un PHF que tiene un peso molecular (es decir, MW del PHF no modificado) que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, aproximadamente 2-20 kDa o aproximadamente 3-15 kDa o aproximadamente 5-10 kDa). Por ejemplo El PHF tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, 8 kDa, 10 kDa, 13 kDa o 15 kDa.

- 15 Las PBRM en este rango de peso molecular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, tales como, IgG, IgM.

- 20 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ia) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa (es decir, la suma de m , m_1 , m_2 , y m_3 que varía de 1 a 300), m_2 es un entero de 1 a aproximadamente 40, m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 18, y/o m_1 es un entero de 1 a aproximadamente 140 (por ejemplo, m_1 siendo aproximadamente 1-90).

Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ia) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa (es decir, la suma de m , m_1 , m_2 , y m_3 que varía de 1 a 150), m_2 es un entero de 1 a aproximadamente 20, m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 10, y/o m_1 es un entero de 1 a aproximadamente 70 (por ejemplo, m_1 siendo aproximadamente 4-45).

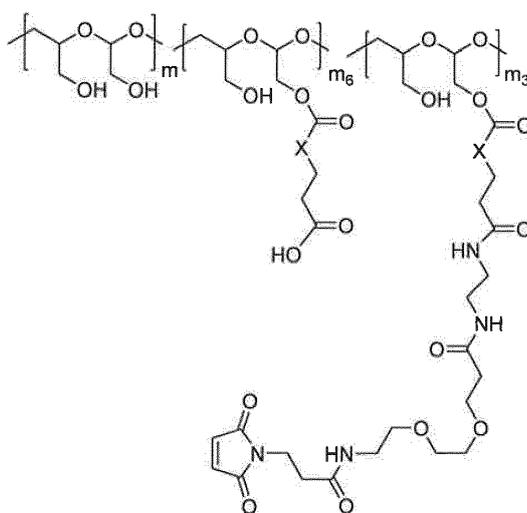
- 25 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ia) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa (es decir, la suma de m , m_1 , m_2 , y m_3 que varía de 1 a 110), m_2 es un entero de 2 a aproximadamente 15, m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 8, y/o m_1 es un entero de 2 a aproximadamente 50 (por ejemplo, m_1 siendo aproximadamente 4-30).

- 30 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ia) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa (es decir, la suma de m , m_1 , m_2 , y m_3 que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 75), m_2 es un entero de 3 a aproximadamente 10, m_3 es un entero de 1 a aproximadamente 5, y/o m_1 es un entero de 5 a aproximadamente 35 (por ejemplo, m_1 siendo aproximadamente 10-25).

- 35 Por ejemplo, uno o más portadores poliméricos portadores de fármacos están conectados a una PBRM. Por ejemplo, el armazón (por ejemplo, un conjugado de PBRM-polímero-fármaco) comprende una PBRM con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o más y uno o más portadores poliméricos que llevan D conectados a la PBRM.

Por ejemplo, el armazón comprende además una PBRM conectado al soporte polimérico a través del grupo maleimido.

La invención también proporciona armazones poliméricos de Fórmula (Ic) de peso molecular que varían de 2 kDa a 40 kDa;



(Ic),

en donde:

X es CH₂, O, o NH;

m es un entero de 1 a aproximadamente 300,

5 m₆ es un entero de 2 a 180,

m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 18, y

la suma de m, m₆, y m₃ varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300.

Por ejemplo, cada presencia de la unidad estructural maleimido en la unidad "m₃" de Fórmula (Ic) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.

10 Por ejemplo, cada presencia de la unidad estructural maleimido en la unidad "m₃" de Fórmula (Ic) debe aún formar un enlace covalente con un grupo funcional de la PBRM.

15 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ic) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 20 kDa (es decir, la suma de m, m₆, y m₃ que varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 150), m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 9, y/o m₆ es un entero de 2 a aproximadamente 90 (por ejemplo, m₆ siendo aproximadamente 6-60).

Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ic) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 15 kDa (es decir, la suma de m, m₆, y m₃ que varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 110), m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 8, y/o m₆ es un entero de 4 a aproximadamente 65 (por ejemplo, m₆ siendo aproximadamente 6-45).

20 Por ejemplo, cuando el PHF en la Fórmula (Ic) tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, la suma de m, m₆ y m₃ varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 75, m₆ es un entero de aproximadamente 8 a aproximadamente 45, y m₃ es un entero de 1 a aproximadamente 5.

25 En algunas realizaciones, el armazón polimérico (por ejemplo, un polímero de poliactal tal como PHF) se conjuga con las PBRM utilizando una estrategia de bioconjugación basada en cisteína. Véase, por ejemplo, los documentos WO2010100430 y US 7,595,292. En una realización, el armazón polimérico (por ejemplo, un polímero de poliactal tal como PHF) se conjuga con una PBRM (por ejemplo, un anticuerpo) a través de cisteínas en la región bisagra del anticuerpo. Sin desear estar limitado por la teoría, el conjugado resultante se estabiliza a través de la formación de estructuras de puentes entre cadenas.

30 Por consiguiente, también se describe en este documento un armazón polimérico (por ejemplo, un polímero de polial) que comprende al menos dos unidades estructurales conectadas al armazón polimérico, en el que cada unidad estructural es capaz de conjugarse con un grupo tiol de un aminoácido (por ejemplo, cisteína) en una PBRM para formar un conjugado de proteína-polímero. En una realización, las al menos dos unidades estructurales conectadas al armazón polimérico son grupos de maleimida.

35 En realizaciones, uno o más grupos tiol libres de una PBRM se producen reduciendo una proteína. El uno o más grupos tiol libres de la PBRM reaccionan entonces con las al menos dos unidades estructurales contenidas en el

almazón de polímero que son capaces de conjugarse con un grupo tiol desde un aminoácido para conjugar la PBRM con el almacén de polímero. En una realización, las al menos dos unidades estructurales conectadas al almacén polimérico son grupos de maleimida.

5 En realizaciones, los grupos tiol libres de la PBRM que se usan para la conjugación se derivan de un puente disulfuro de una proteína nativa o un puente disulfuro de un complejo proteico que consiste en dos o más cadenas de proteínas conectadas por el puente disulfuro. Un puente disulfuro puede ser entre cadenas o puente entre cadenas. Alternativamente, los grupos tiol libres de la PBRM son de cisteínas o los grupos tiol no pareados de la proteína nativa que no están involucrados en la formación de puentes inter o intra disulfuro.

10 Los enlaces disulfuro se pueden reducir, por ejemplo, con ditioneitol, mercaptoetanol, tris-carboxietilfosfina, ácido deshidroascórbico, sulfato de cobre, usando métodos convencionales. Una proteína puede contener uno o más puentes disulfuro. La reducción para dar grupos tiol libres se puede controlar para reducir uno o más puentes disulfuro específicos en una proteína. Dependiendo de la extensión de la reducción de disulfuro y la estequiometría de las unidades estructurales en el almacén polimérico, es posible conjugar uno o más armazones poliméricos a la proteína. Se pueden usar agentes reductores inmovilizados si se desea reducir menos que el número total de disulfuros, al igual que la reducción parcial utilizando diferentes condiciones de reacción o la adición de desnaturalizantes.

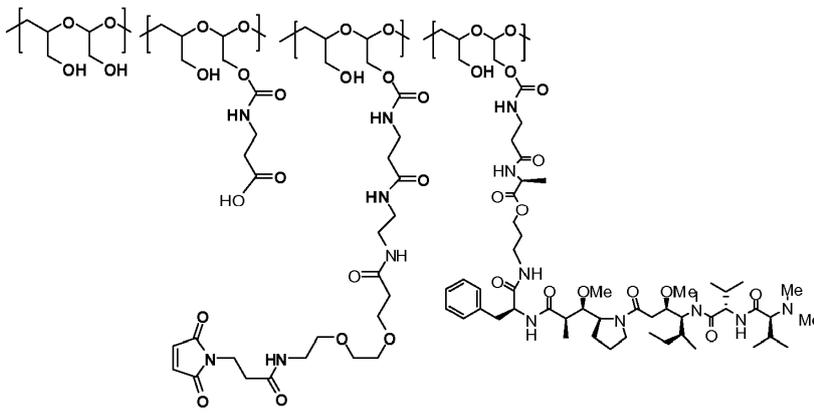
15 Las ventajas de conjugar un polímero con una proteína a través de un tiol incluyen, pero no se limitan a eficacia optimizada, consistencia mejorada de dosis a dosis y homogeneidad (ya que el número de moléculas poliméricas conjugadas por proteína es sustancialmente la misma para cada molécula de proteína), conjugación específica dirigida a un residuo específico o residuos en cada proteína, y más fácil de purificar. Además, los conjugados de proteína-polímero a través de la conjugación de tiol exhiben una vida media, tiempo de residencia promedio, y/o tasa de eliminación en circulación sustancialmente mejorados en comparación con la proteína no conjugada.

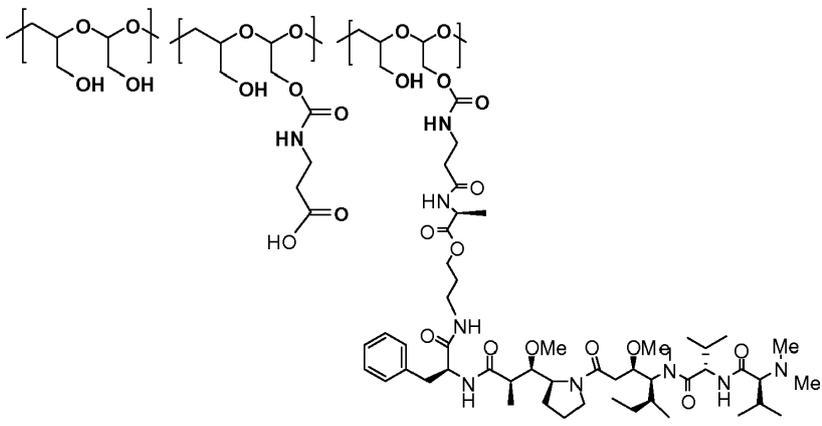
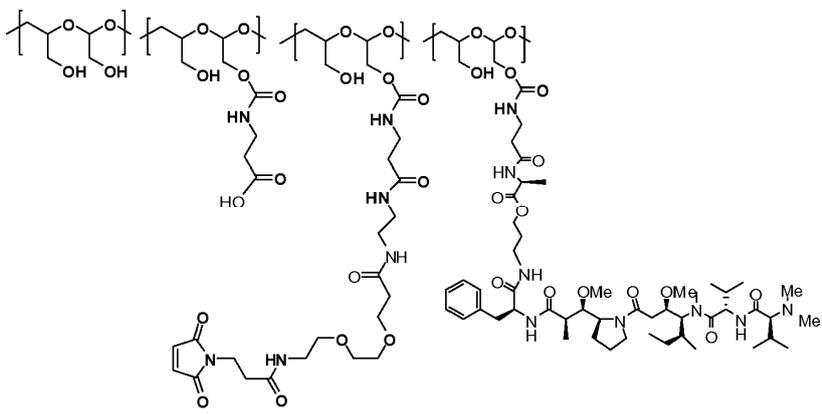
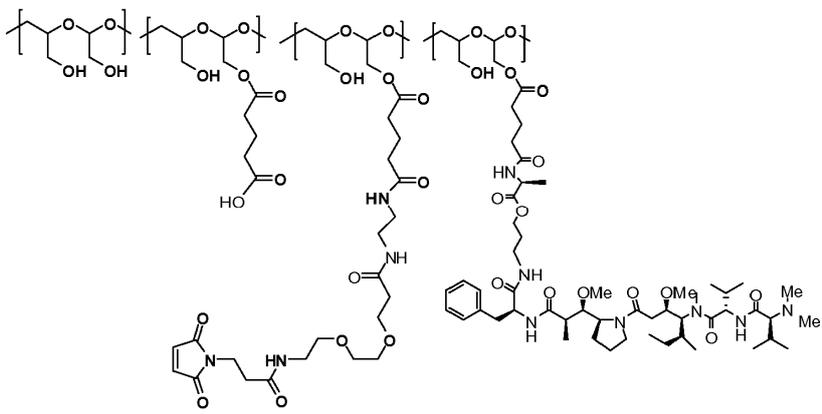
20 En algunas realizaciones, los conjugados fármaco-polímero-PBRM, conjugados fármaco-polímero, armazones poliméricos portadores de fármaco, o armazones poliméricos portadores de PBRM descritos en el presente documento tienen cada uno un índice de polidispersidad (PDI) de ≤ 1.5 , por ejemplo, < 1.2 .

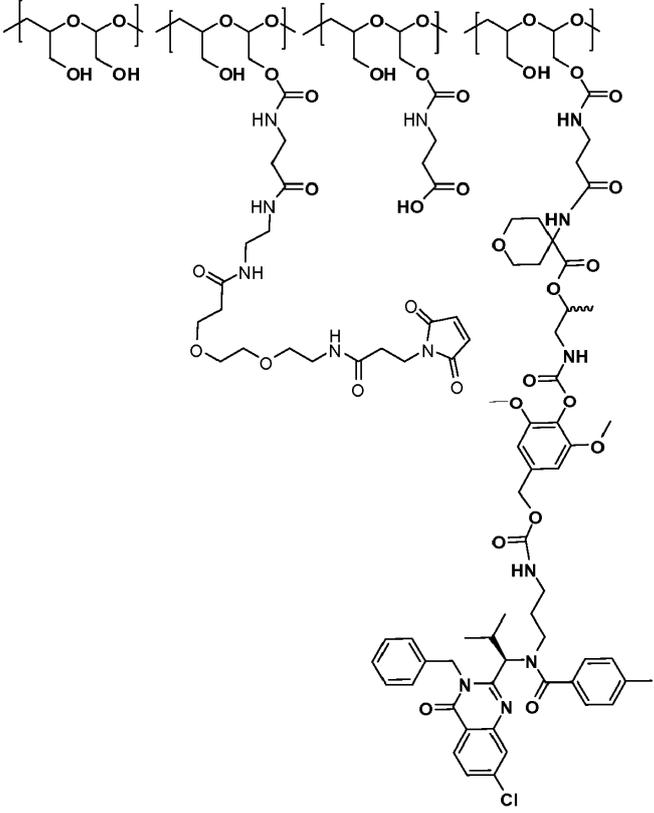
25 Los conjugados de PBRM-polímero-fármaco, los armazones poliméricos portadores del fármaco, o los armazones poliméricos portadores de PBRM se pueden purificar (es decir, la eliminación del fármaco residual sin reaccionar, PBRM o materiales de partida poliméricos) mediante diafiltración extensa. Si es necesario, se puede realizar una purificación adicional mediante cromatografía de exclusión por tamaño para eliminar cualquier conjugado de PBRM-polímero-fármaco agregado. En general, los conjugados de PBRM-fármaco-polímero purificados típicamente contienen menos del 5% (por ejemplo, $< 2\%$ p/p) de conjugados de PBRM-fármaco-polímero agregados según lo determinado por SEQ; menos del 0.5% (por ejemplo, $< 0.1\%$ p/p) de fármaco libre (no conjugado) según lo determinado por RP-HPLC; menos del 1% de conjugado de polímero-fármaco según lo determinado por la SEQ y menos del 2% (por ejemplo, $< 1\%$ p/p) de PBRM no conjugado según lo determinado por HIC-HPLC.

35 Las tablas C y D a continuación proporcionan ejemplos de los armazones poliméricos portadores de fármacos y los conjugados de polímero-fármaco-proteína previstos aquí respectivamente. En la Tabla D, m_s en las estructuras químicas se define como en la Fórmula (Ib) descrita en este documento.

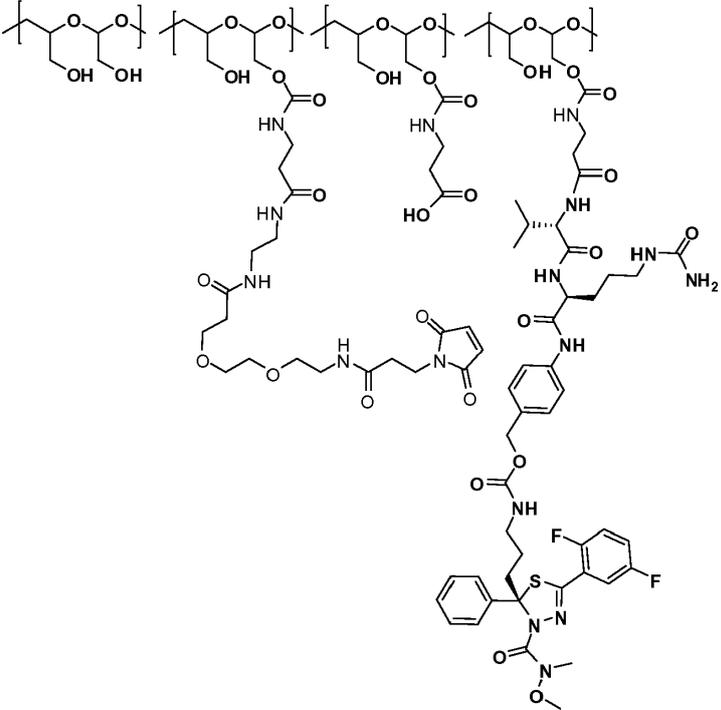
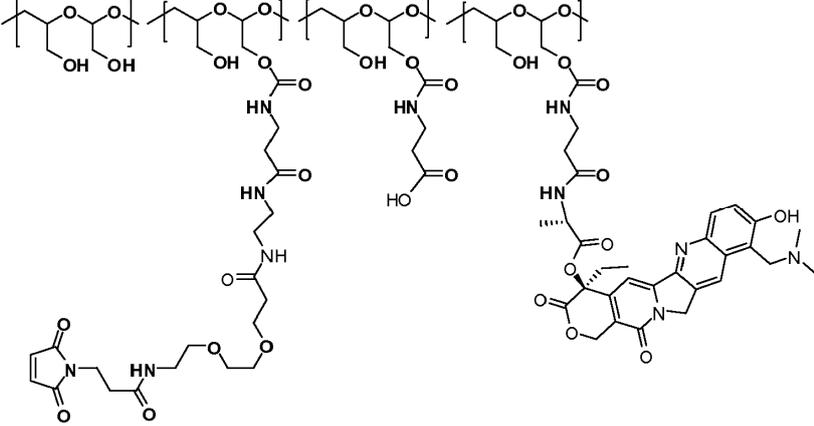
Tabla C

Ref #	Relación de fármaco:polímero	Estructura
Ej. 3	6:1	

Ref #	Relación de fármaco:polímero	Estructura
Ej. 5	6:1	
Ej. 6	6:1	
Ej. 12	4.5:1	

Ref #	Relación de fármaco:polímero	Estructura
Ej. 25	1.7:1	

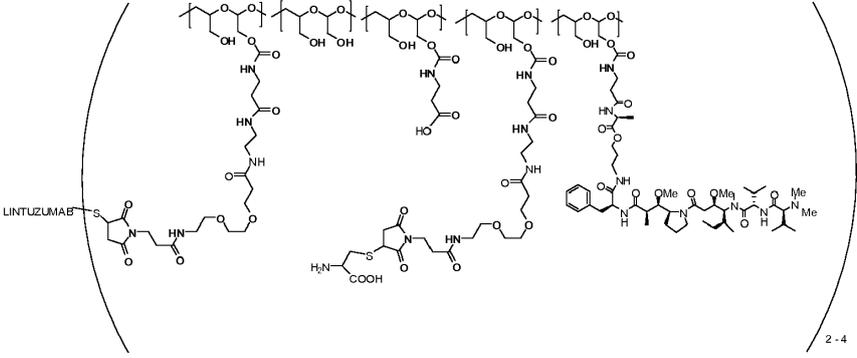
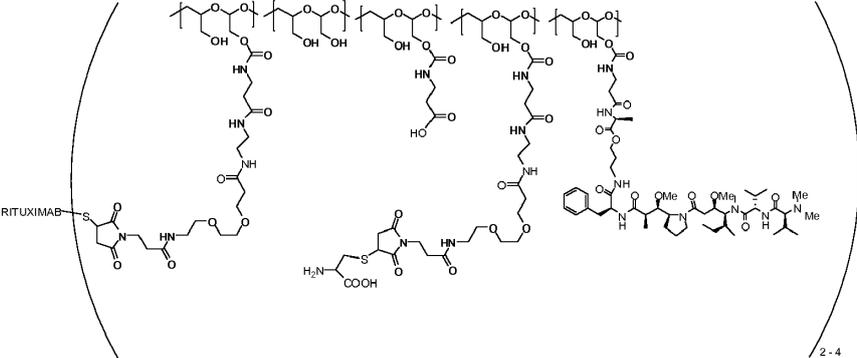
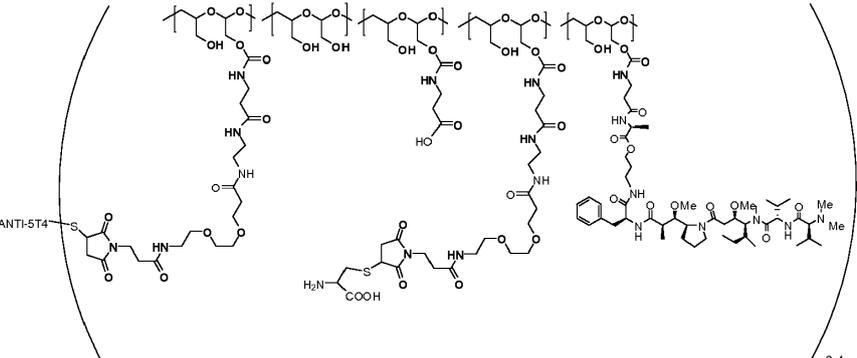
Ref #	Relación de fármaco:polímero	Estructura
Ej. 29	2.2:1	
Ej. 32	5.7:1	

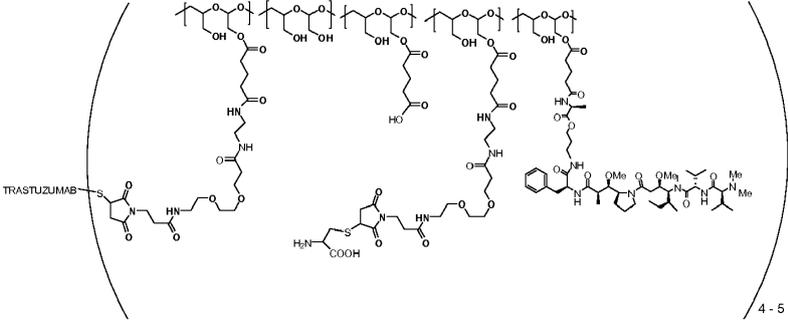
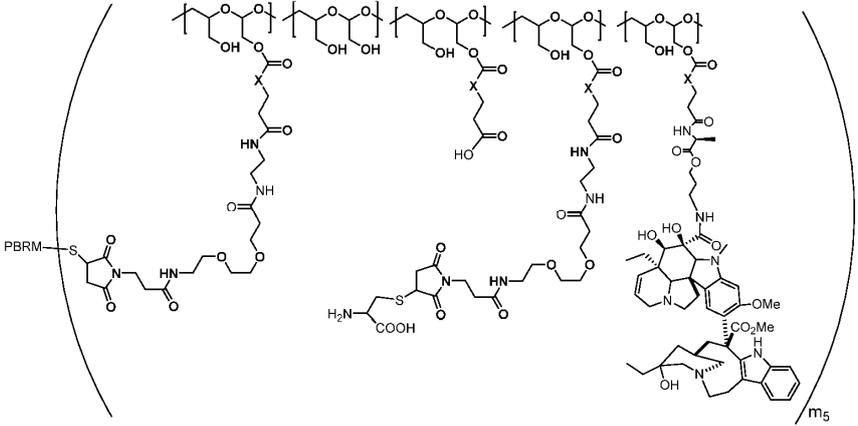
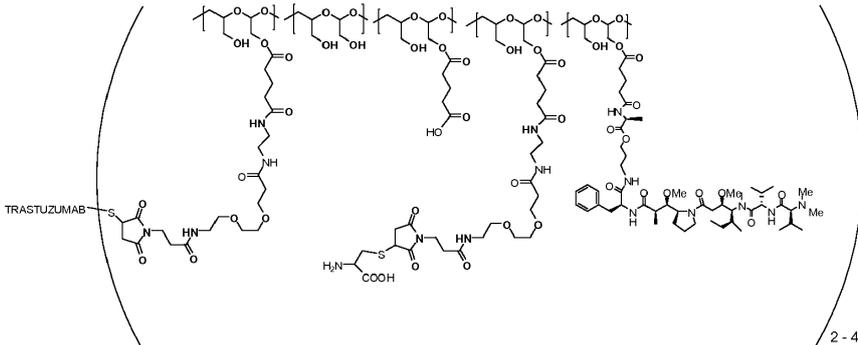
Ref #	Relación de fármaco:polímero	Estructura
Ej. 37	2.1:1	
Ej. 42	4.2:1	

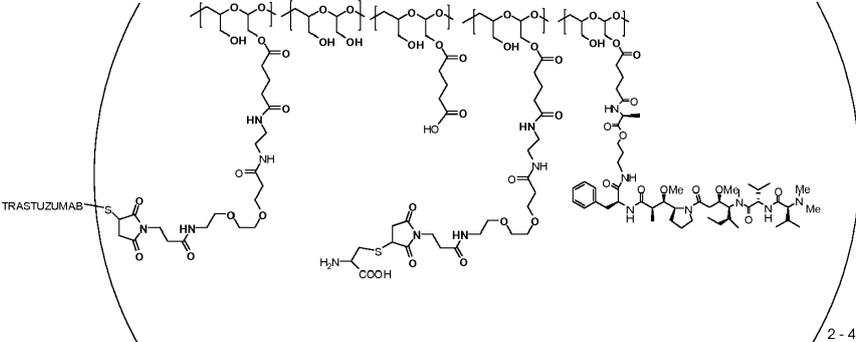
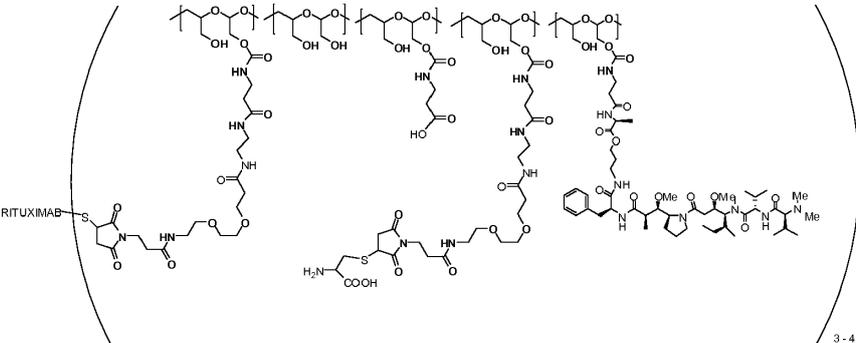
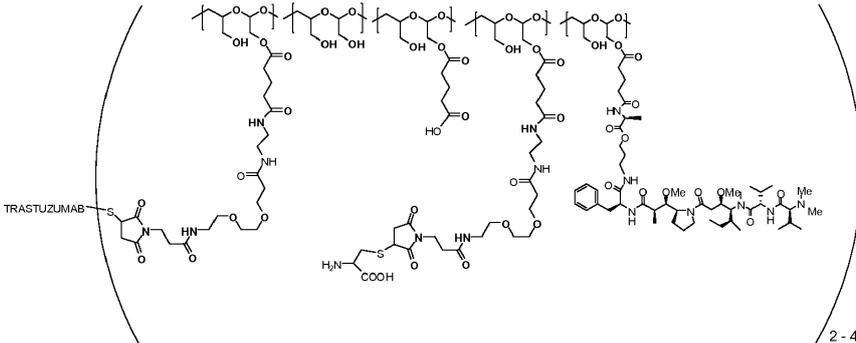
Ref #	Relación de fármaco:polímero	Estructura

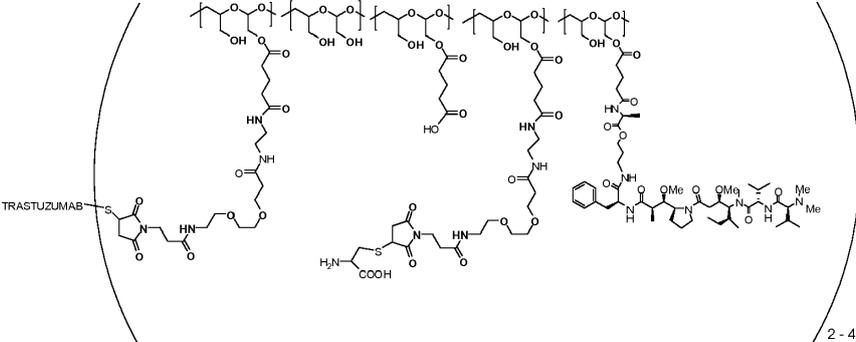
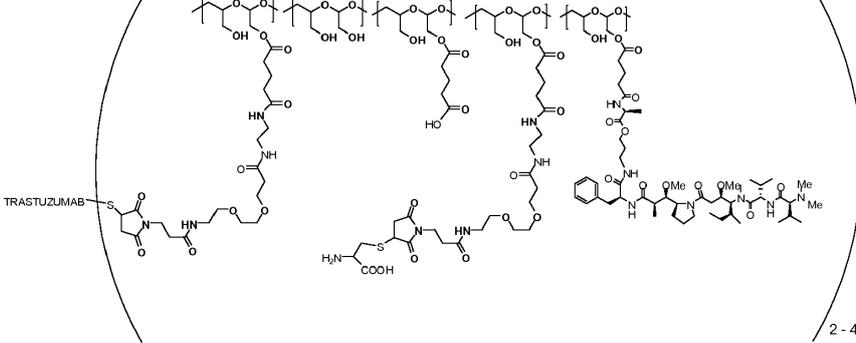
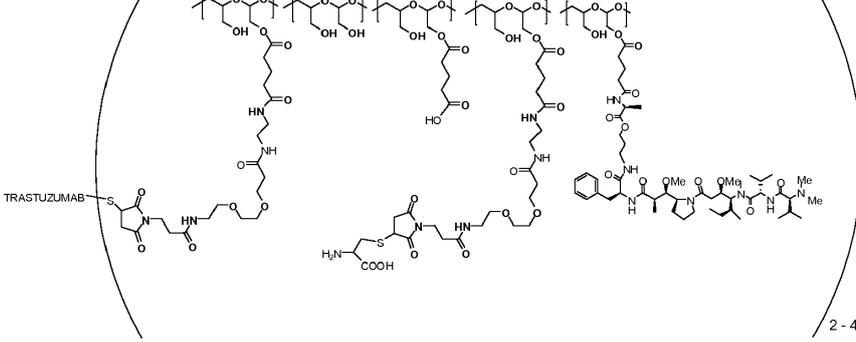
Tabla D

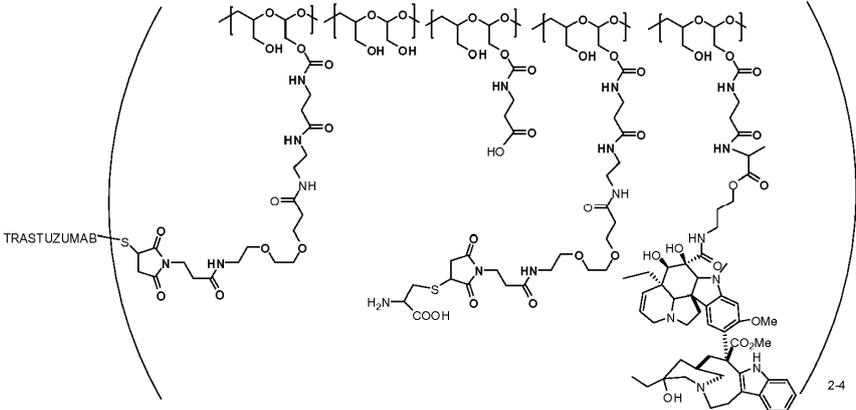
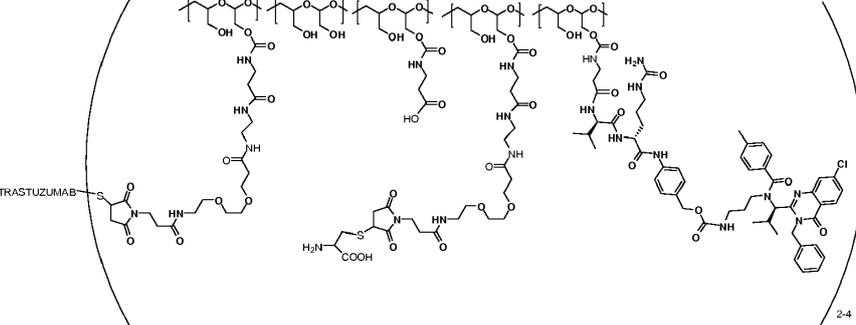
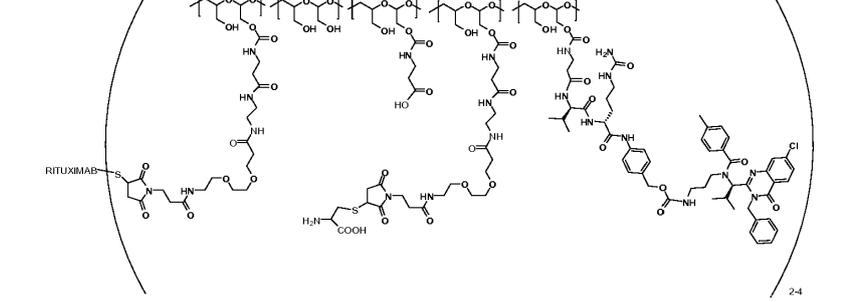
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
<p>Ej. 4</p> <p>Ej. 7</p>	<p>12:1 a 17:1</p> <p>16:1 a 21:1</p>	

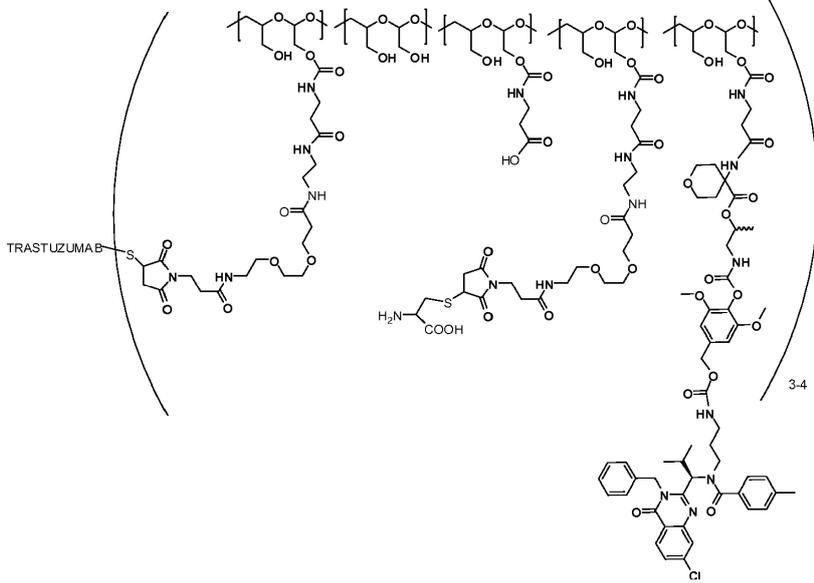
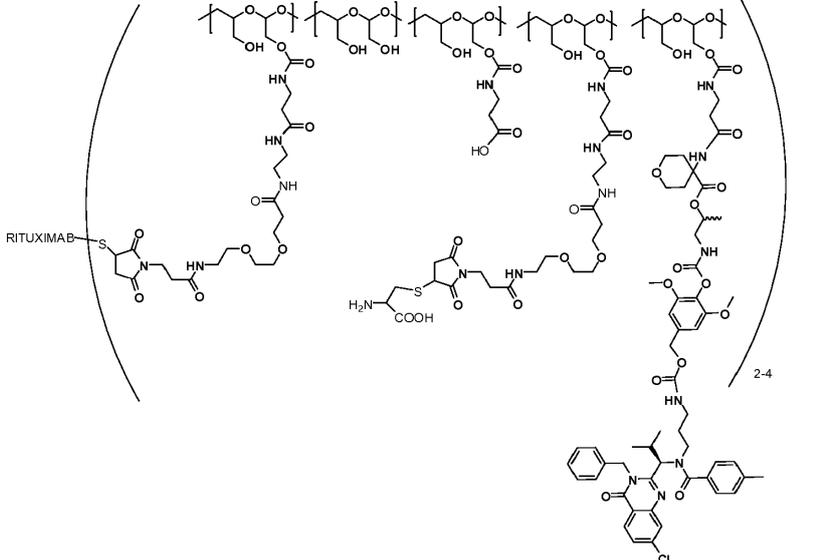
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 8	10:1 a 15:1	 <p>Chemical structure of Lintuzumab antibody, showing the heavy chain (left) and light chain (right) with various amino acid side chains and a disulfide bridge. The heavy chain is labeled LINTUZUMAB.</p> <p style="text-align: right;">2-4</p>
Ej. 9	13:1 a 18:1	 <p>Chemical structure of Rituximab antibody, showing the heavy chain (left) and light chain (right) with various amino acid side chains and a disulfide bridge. The heavy chain is labeled RITUXIMAB.</p> <p style="text-align: right;">2-4</p>
Ej. 10	12:1 a 18:1	 <p>Chemical structure of Anti-ST4 antibody, showing the heavy chain (left) and light chain (right) with various amino acid side chains and a disulfide bridge. The heavy chain is labeled ANTI-ST4.</p> <p style="text-align: right;">2-4</p>

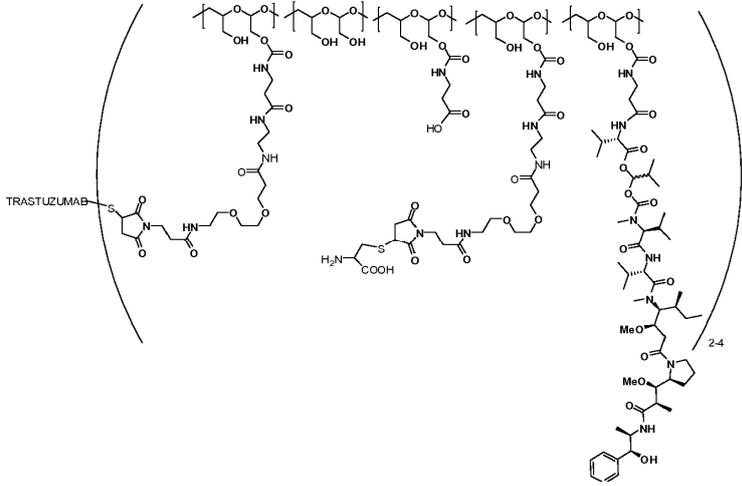
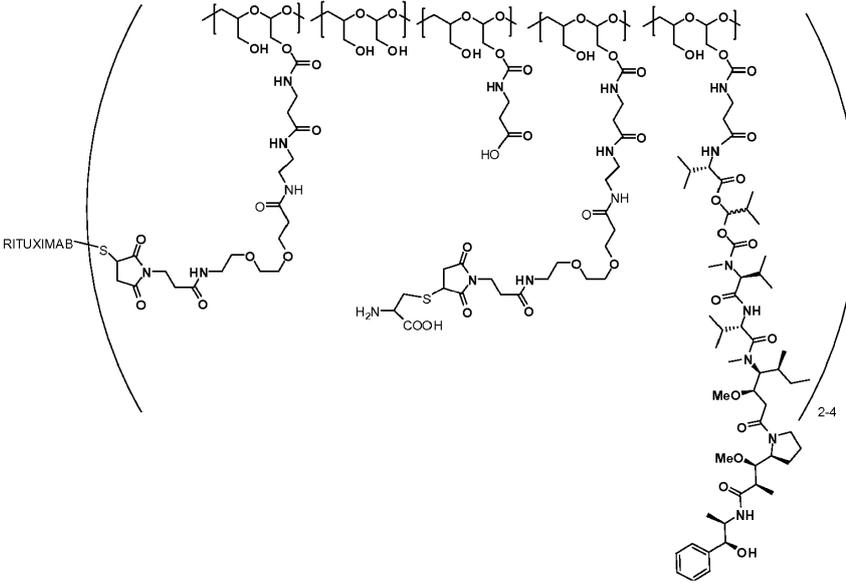
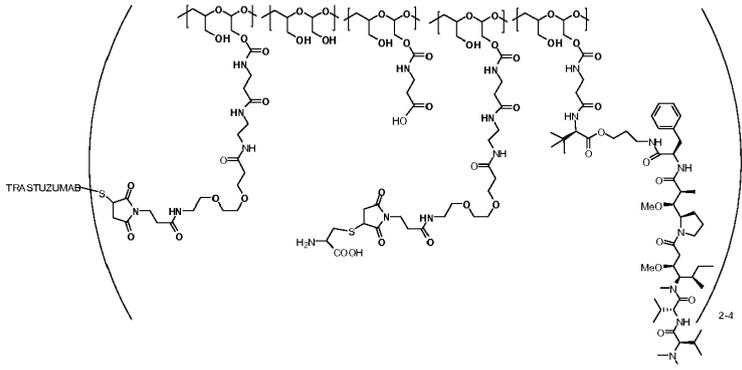
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 13	18:1 a 23:1	 <p>The diagram shows the chemical structure of Trastuzumab, a monoclonal antibody, represented as a large Y-shaped molecule. It is conjugated with PBRM (a cyclic peptide) at various sites along its heavy chain. The PBRM units are shown as smaller structures attached to the antibody's backbone. The label 'TRASTUZUMAB' is on the left, and '4 - 5' is in the bottom right corner.</p>
		 <p>This diagram illustrates the PBRM conjugation sites on the antibody. The PBRM units are shown as cyclic peptides with a variable linker 'X' connecting them to the antibody backbone. The label 'PBRM' is on the left, and 'm5' is in the bottom right corner.</p>
Ej. 14	10:1 a 15:1	 <p>The diagram shows the chemical structure of Trastuzumab, similar to Ej. 13, but with a different ratio of PBRM conjugation. The label 'TRASTUZUMAB' is on the left, and '2 - 4' is in the bottom right corner.</p>

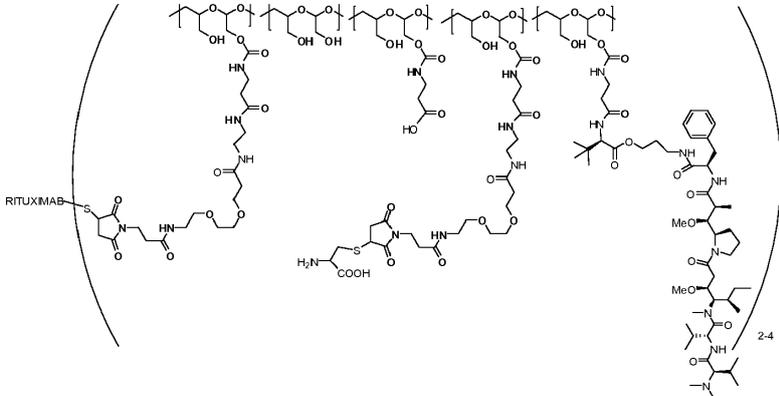
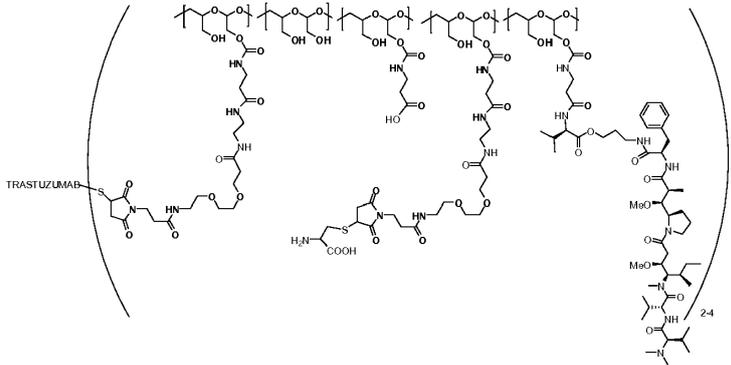
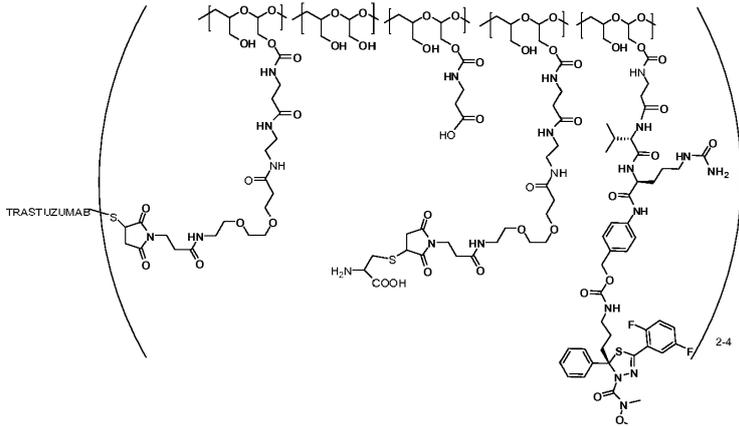
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 15	11:1 a 16:1	 <p style="text-align: right;">2 - 4</p>
Ej. 16	13:1 a 18:1	 <p style="text-align: right;">3 - 4</p>
Ej. 17	5:1 a 10:1	 <p style="text-align: right;">2 - 4</p>

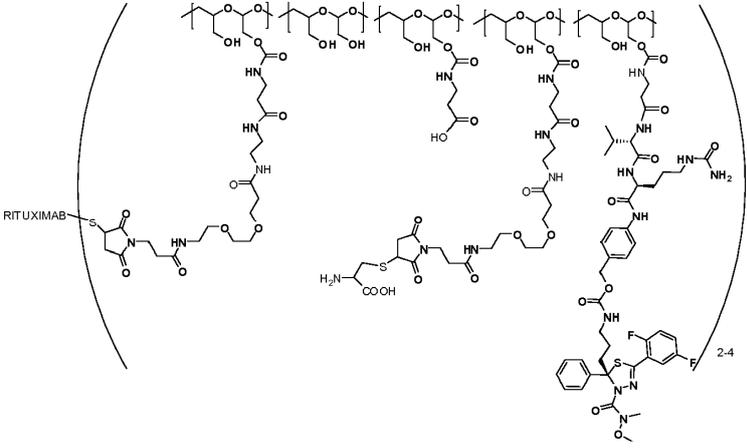
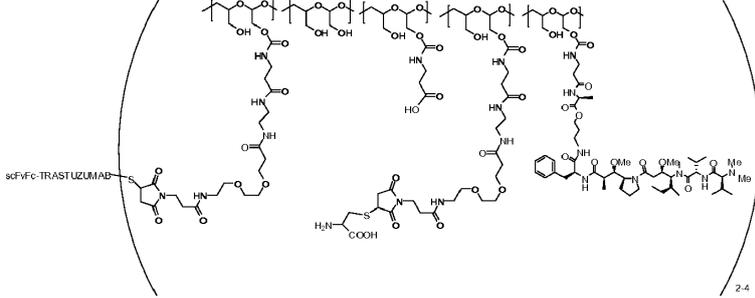
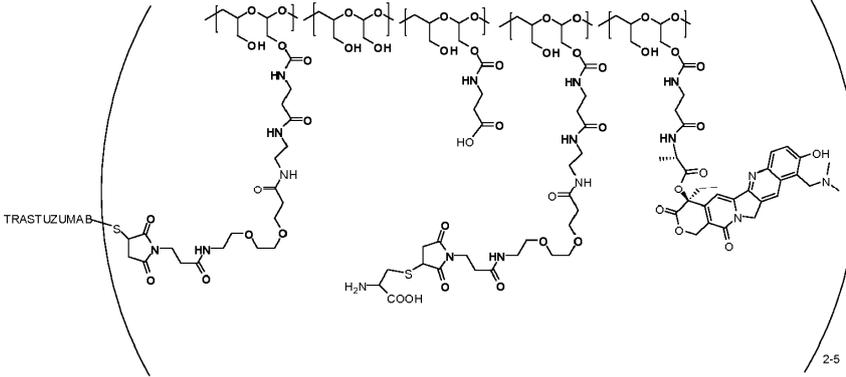
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 18 A	19:1 a 24:1	
Ej. 18 B	20:1 a 25:1	
Ej. 18 C	23:1 a 28:1	

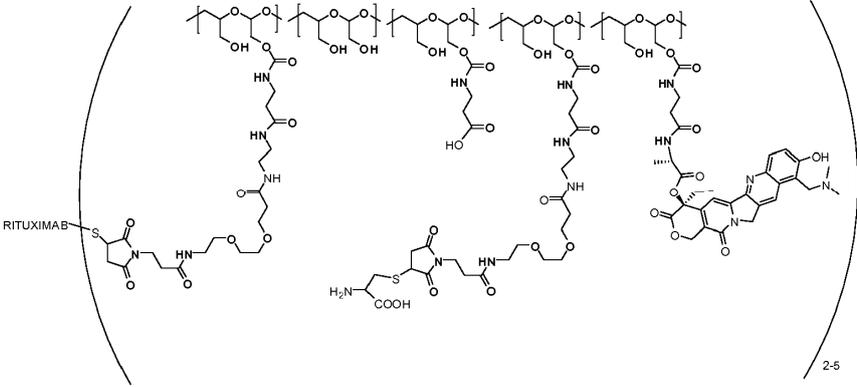
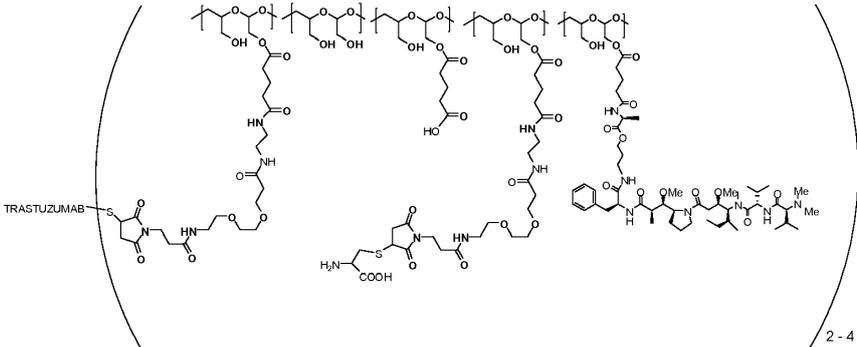
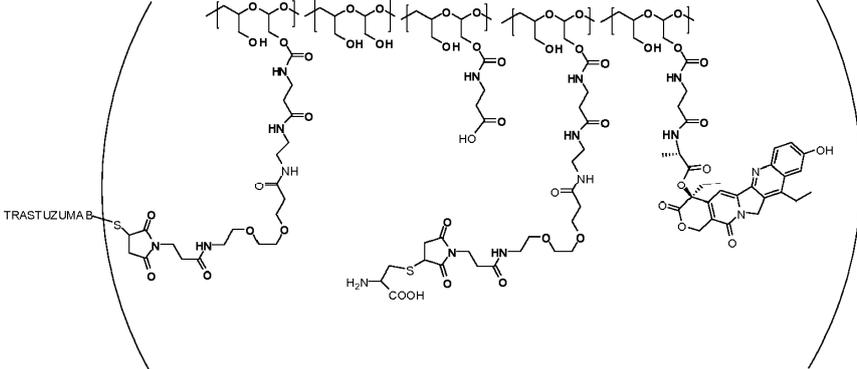
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
<p>Ej. 20A</p> <p>Ej. 20B</p> <p>Ej. 20C</p>	<p>13:1 a 18:1</p> <p>10:1 a 14:1</p> <p>8.5:1 a 12:1</p>	 <p>TRASTUZUMAB</p> <p>2-4</p>
<p>Ej. 22</p>	<p>7.5:1 a 10:1</p>	 <p>TRASTUZUMAB</p> <p>2-4</p>
<p>Ej. 23</p>	<p>6.5:1 a 10:1</p>	 <p>RITUXIMAB</p> <p>2-4</p>

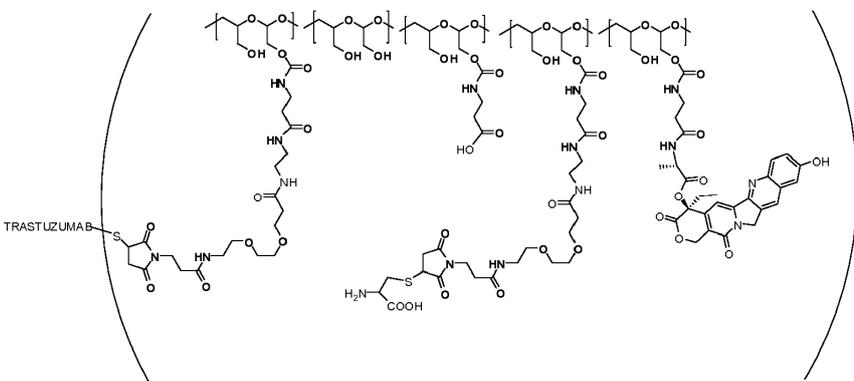
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 26	5:1 a 8:1	
Ej. 27	4.5:1 a 7:1	

Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
<p>Ej. 30A Ej. 30B</p>	<p>11:1 a 15:1 12:1 a 16.5:1</p>	
<p>Ej. 30C</p>	<p>9.5:1 a 13:1</p>	
<p>Ej. 33</p>	<p>4:1 a 6:1</p>	

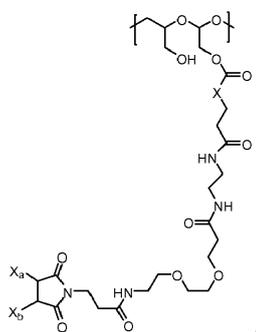
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 34	2.5:1 a 3.5:1	 <p>RITUXIMAB</p> <p>2-4</p>
Ej. 36	14.5:1 a 20:1	 <p>TRASTUZUMAB</p> <p>2-4</p>
Ej. 38	4:1 a 6:1	 <p>TRASTUZUMAB</p> <p>2-4</p>

Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 39	4:1 a 6:1	 <p>The structure shows a heavy chain of the Rituximab antibody framework (top) and a light chain (bottom). A linker is attached to the heavy chain, which is further connected to a fluorinated benzimidazole derivative. The derivative has a methyl group and a trifluoromethyl group on the benzimidazole ring, and a phenyl ring with a fluorine atom at the 2-position. The label 'RITUXIMAB' is on the left, and '2-4' is at the bottom right.</p>
Ej. 40	14:1 a 19:1	 <p>The structure shows a heavy chain of the sFvFc-TRASTUZUMAB antibody framework (top) and a light chain (bottom). A linker is attached to the heavy chain, which is further connected to a complex heterocyclic derivative. The derivative features a benzimidazole core with a trifluoromethyl group and a methyl group, and a complex side chain including a phenyl ring, a methyl group, and a trifluoromethyl group. The label 'sFvFc-TRASTUZUMAB' is on the left, and '2-4' is at the bottom right.</p>
Ej. 42A	19:1 a 26:1	 <p>The structure shows a heavy chain of the TRASTUZUMAB antibody framework (top) and a light chain (bottom). A linker is attached to the heavy chain, which is further connected to a complex heterocyclic derivative. The derivative features a benzimidazole core with a trifluoromethyl group and a methyl group, and a complex side chain including a phenyl ring, a methyl group, and a trifluoromethyl group. The label 'TRASTUZUMAB' is on the left, and '2-5' is at the bottom right.</p>

Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 42B	16:1 a 22:1	 <p>RITUXIMAB</p> <p>2-5</p>
Ej. 43A Ej. 43B Ej. 43C	6:1 a 9:1 12:1 a 17:1 12:1 a 16:1	 <p>TRASTUZUMAB</p> <p>2 - 4</p>
Ej. 44		 <p>TRASTUZUMAB</p>

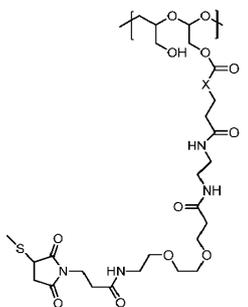
Ref #	Relación de Fármaco: PBRM	Estructura
Ej. 45		

5 En un ejemplo adicional, se proporciona un fármaco terapéutico anti-5T4 y un conjugado de direccionamiento. El conjugado comprende (a) un ligando (LG) que es una inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma que se dirige a la proteína oncofetal humana 5T4, el ligando que tiene un peso molecular superior a aproximadamente 40 kD y que tiene unido al mismo m_5 de armazones poliméricos de (b), en donde m_5 es de uno a aproximadamente diez, y (b) el armazón polimérico que comprende poli(1-hidroximetil-etilen hidroximetil-formal) (PHF) que tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa, en donde el armazón polimérico comprende unidades monoméricas dispuestas al azar m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} , definidas de la siguiente manera: (i) m_{3a} :



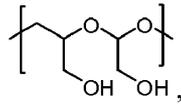
10 en donde m_{3a} está ausente o 1 a aproximadamente 17 unidades m_{3a} monoméricas están presentes en el armazón polimérico, y en cada unidad, X_a y X_b se seleccionan independientemente de (A) uno es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido, o (B) X_a y X_b , junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un doble enlace carbono-carbono;

(ii) m_{3b} , en donde El enlace sulfuro forma el punto de unión a LG, y



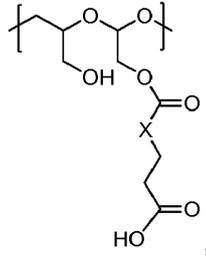
15 en donde 1 a aproximadamente 8 unidades m_{3b} de monómero están presentes en el armazón polimérico, en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es 1 a 18, y en donde el átomo de azufre es parte de LG;

(iii) m :



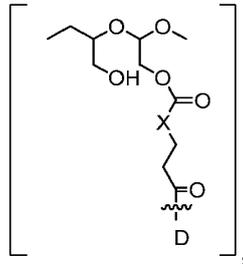
en donde 1 a aproximadamente 300 unidades m de monómero están presentes en el almacén polimérico;

(iv) m_1 :



5 en donde 1 a aproximadamente 140 unidades m_1 monoméricas están presentes en el almacén polimérico; y

(v): m_2 :

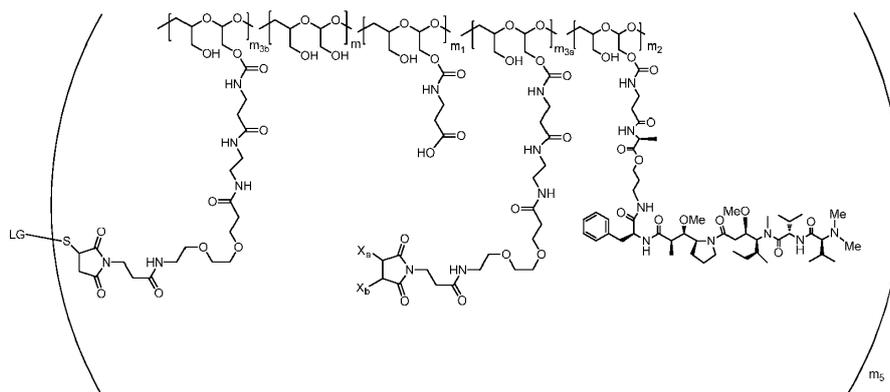


10 en donde 1 a aproximadamente 40 unidades m^2 monoméricas están presentes en el almacén polimérico; en donde in cada uno de las unidades m, m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} monoméricas, X es CH_2 , O o NH y la suma de m, m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 300, y en donde cada presencia de D es independientemente un agente terapéutico que tiene un peso molecular de $\leq 5\text{kDa}$, y la



15 entre D y el grupo carbonilo denota la unión directa o indirecta de D al grupo carbonilo. Adecuadamente, el ligando anti-5T4 es una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma como se define en el presente documento. Por ejemplo, la inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, una inmunoadhesina, un F(Ab)₂, un minicuerpo, Fab', un anticuerpo de dominio individual, un nanocuerpo, un Fv de una sola cadena, un tándem/bis-scFv, un F(ab)₃, un scFv-Fc (o scFvFc), un dsFv, un diacuerpo, un triacuerpo y un tetracuerpo.

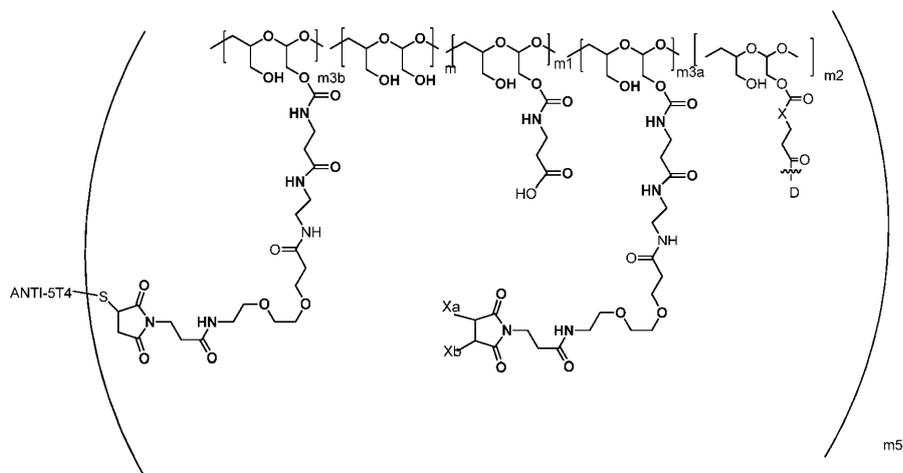
20 En un ejemplo adicional, el fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento se caracterizan por las estructuras ilustradas en la Fórmula (E):



(E),

5 en donde: el PHF tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa; m es 1 a 75, m_1 es aproximadamente 5 a aproximadamente 35, m_2 es aproximadamente 3 a aproximadamente 10, m_{3a} es 0 a aproximadamente 4, m_{3b} es 1 a aproximadamente 5, la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} es aproximadamente 40 a aproximadamente 75, y m_5 es 2 a aproximadamente 4.

En una realización adicional, se proporciona un conjugado de direccionamiento de fármaco anti-5T4 útil en terapias antineoplásicas, que comprende un armazón polimérico que comprende un PHF que tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa, en donde el conjugado es de la siguiente estructura:



10 en donde m_5 es 1 a 10; m es un entero de 1 a 300; m_1 es un entero de 1 a 140; m_2 es un entero de 1 a 40; m_{3a} es un entero de 0 a 17; m_{3b} es un entero de 1 a 8; en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es un entero de 1 a 18; y la suma de m , m_1 , m_2 y m_3 varía de aproximadamente 15 a 300; X es NH; uno de Xa o Xb es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido; y donde cada presencia de D es independientemente un agente terapéutico que tiene un peso molecular de ≤ 5 kDa, y la

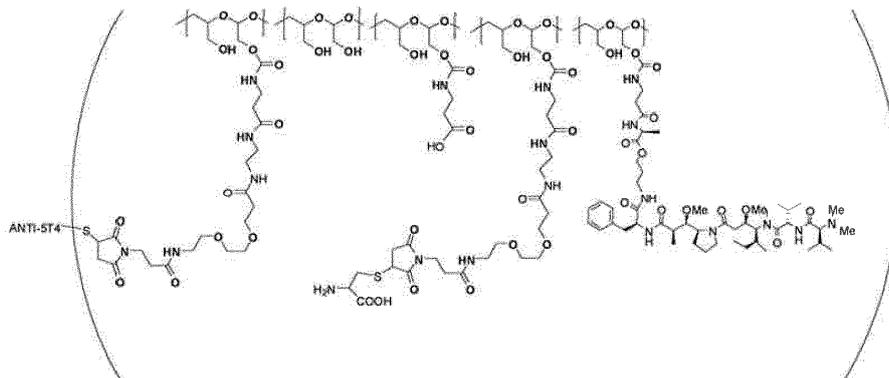


entre D y el grupo carbonilo denota la unión directa o indirecta de D al grupo carbonilo; en el que el ANTI-5T4 es un ligando anti-5T4 que comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma que es selectiva para el antígeno 5T4 de oncofetal humano. Por ejemplo, el peso molecular del anti-5T4 es de al menos aproximadamente 40 kDa. En una realización, D es una auristatina o un análogo de la misma unido a la unidad estructural carbonilo de m_2 a través de una unidad estructural hidroxipropilamida-L-alanina. En una realización, la relación del fármaco a anti-5T4 es aproximadamente 5:1 a aproximadamente 30:1, o aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1. En otra realización, la relación promedio del conjugado de fármaco PHF al anticuerpo anti-5T4 es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

25 Estos conjugados pueden definirse adicionalmente mediante porcentajes molares o fracciones molares de las diversas unidades que forman el conjugado. Por ejemplo, la unidad monomérica que comprende la unidad estructural maleimida de dietilenglicol (EG2-MI) unia al ligando tiene una fracción molar de aproximadamente 2% molar a aproximadamente 5% molar. En otro ejemplo adicional, la unidad monomérica que lleva el fármaco tiene una fracción molar de

aproximadamente 5% molar a aproximadamente 10% molar. Por ejemplo, la relación del fármaco a anti-5T4 es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 30:1, o aproximadamente de 12:1 a aproximadamente 18:1. En un ejemplo adicional, la relación promedio del armazón de PHF que comprende el fármaco al anticuerpo anti-5T4 es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1. En una realización, el conjugado es anti-5T4-((EG2-MI (3%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))). Este conjugado se puede preparar como se describe en el Ejemplo 10, y más en general, en el Esquema 5.

En todavía una realización adicional, se proporciona un fármaco terapéutico y un conjugado de direccionamiento útiles en terapias antineoplásicas, que comprenden anti-5T4 y un armazón polimérico de PHF que comprende las unidades mostradas a continuación que pueden estar conectadas aleatoriamente entre sí,



en donde:

anti-5T4 es un constructo de anticuerpo de cadena única que comprende la secuencia amino de SEQ ID NO: A; el PHF tiene un peso molecular que varía de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 40 kDa; la relación promedio de armazón polimérico a anticuerpo anti-5T4 es aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1; y la proporción de AF-HPA a anticuerpo anti-5T4 es aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1.

Estos conjugados se pueden preparar como se describe en el presente documento y se pueden combinar con portadores adecuados en composiciones adecuadas para el suministro a un sujeto. Estas composiciones pueden contener mezclas de estos conjugados direccionados al fármaco anti-5T4, es decir, una única composición puede contener conjugados direccionados al fármaco anti-5T4 con diferentes fármacos y/o diferentes armazones poliméricos.

Metodos sintéticos

De acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier técnica disponible para hacer que los conjugados o composiciones de la invención los incluyan, y los intermedios y componentes (por ejemplo, portadores y modificadores) útiles para hacerlos. Por ejemplo, se pueden usar métodos semisintéticos y totalmente sintéticos.

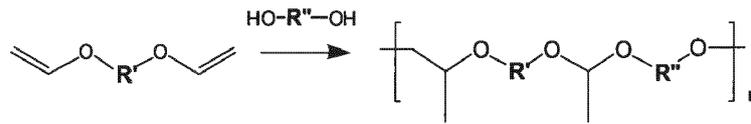
Portadores

Los métodos para preparar portadores poliméricos (por ejemplo, portadores poliméricos biocompatibles, biodegradables) adecuados para la conjugación con modificadores son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la guía sintética se puede encontrar en las patentes U.S. Nos. 5,811,510; 5,863,990; 5,958,398; 7,838,619; 7,790,150; 8,685,383; y 8,815,226. El experto en la técnica sabrá cómo adaptar estos métodos para fabricar portadores de polímeros para uso en la práctica de la invención.

Un método considerado en este documento para formar los conjugados poliales biocompatibles biodegradables de la presente invención comprende un proceso mediante el cual un polisacárido adecuado se combina con una cantidad eficiente de un agente oxidante específico de glicol para formar un intermedio de aldehído. El intermedio de aldehído, que es un polial en sí mismo, puede luego reducirse al polioli correspondiente, succinulado y acoplado con uno o más modificadores adecuados para formar un conjugado polial biocompatible biodegradable que comprende enlaces que contienen succinamida.

En otro método preferido, se pueden preparar poliales biocompatibles biodegradables completamente sintéticos para usar en la presente invención haciendo reaccionar un iniciador adecuado con un compuesto precursor adecuado.

Por ejemplo, los poliales completamente sintéticos se pueden preparar por condensación de éteres de vinilo con dioles sustituidos protegidos. Se pueden usar otros métodos, tales como la polimerización de apertura del ciclo, en los que la eficacia del método puede depender del grado de sustitución y el volumen de los grupos protectores.



Un experto en la técnica apreciará que los sistemas de disolventes, catalizadores y otros factores pueden optimizarse para obtener productos de alto peso molecular.

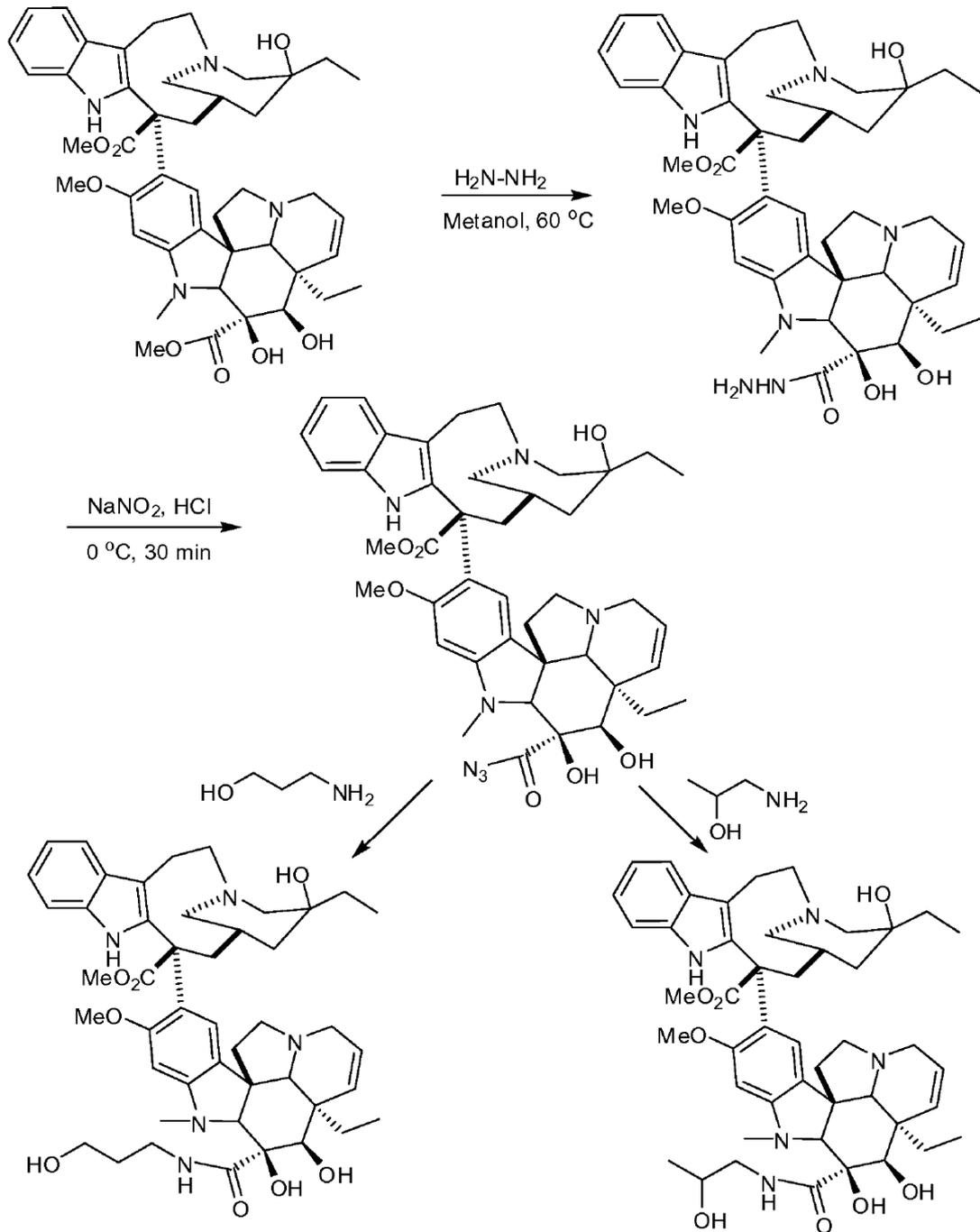
En ciertos métodos, el portador es PHF.

- 5 En métodos, el portador de polímero es PHF que tiene un índice de polidispersidad (PDI) inferior a 1.5, por ejemplo, <1.2.

Fármacos y derivados de fármacos

- 10 En ciertos métodos, el fármaco puede modificarse antes de la conjugación con el portador polimérico. Los esquemas 1 y 2 son métodos ilustrativos para modificar un alcaloide Vinca. El esquema 3 muestra un método para modificar un derivado de camptotecina no natural. El esquema 4 muestra un método para modificar la auristatina F. Más métodos de modificación se describen en el documento US 2010/0305149.

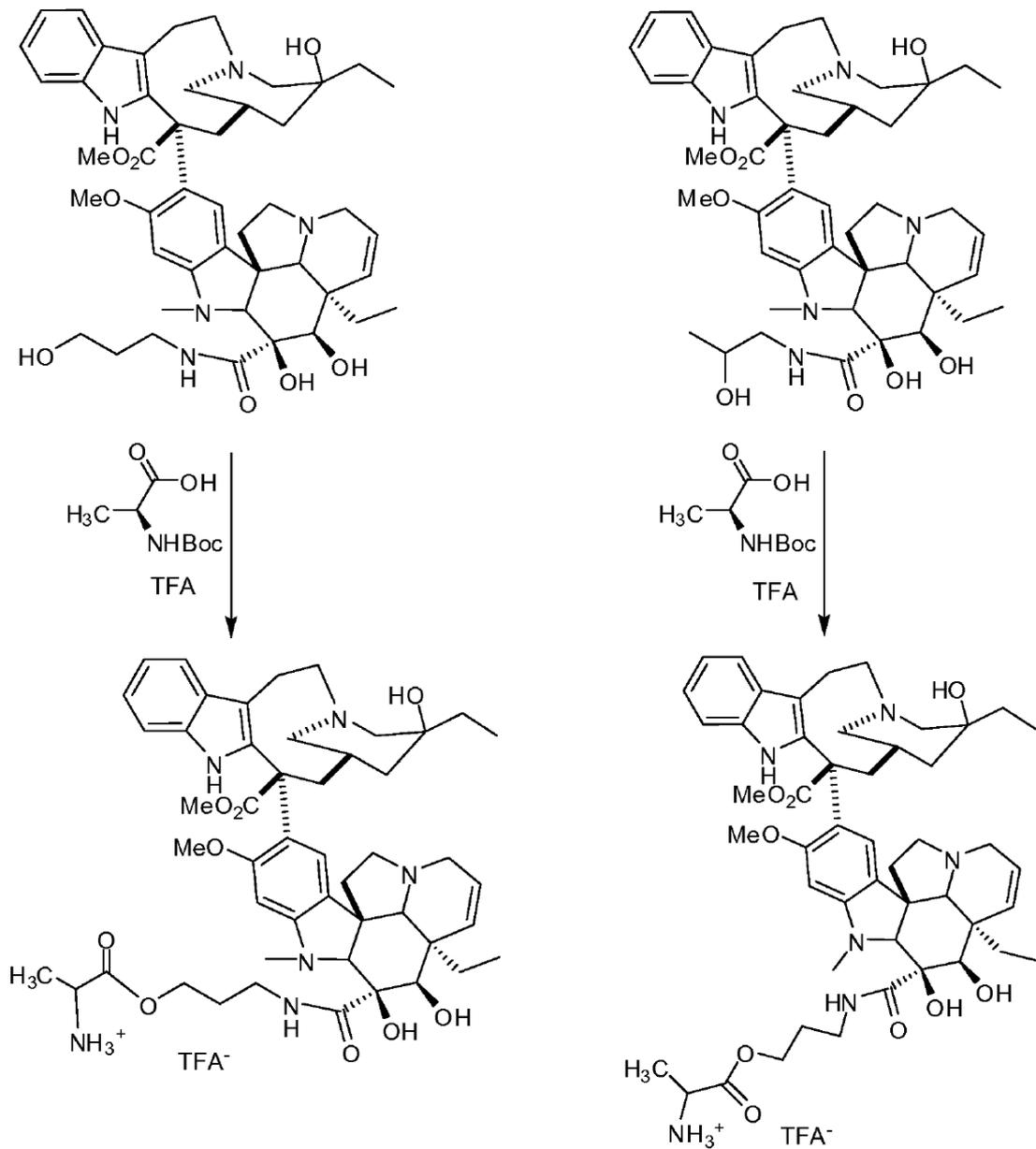
Esquema 1



La reacción del éster C₂₃ de un alcaloide vinca con hidracina seguido de un tratamiento con NaNO₂ da como resultado un éster de azido activo. La reacción del éster de azido con un compuesto amino tal como propanolamina o 1-aminopropan-2-ol da como resultado un derivado alcaloide vinca con un hidroxilo funcionalizado que puede derivarse adicionalmente con compuestos que contienen amino, tal como por ejemplo derivados de alanina o metil alanina, para conjugación con polímeros (véase Esquema 1).

5

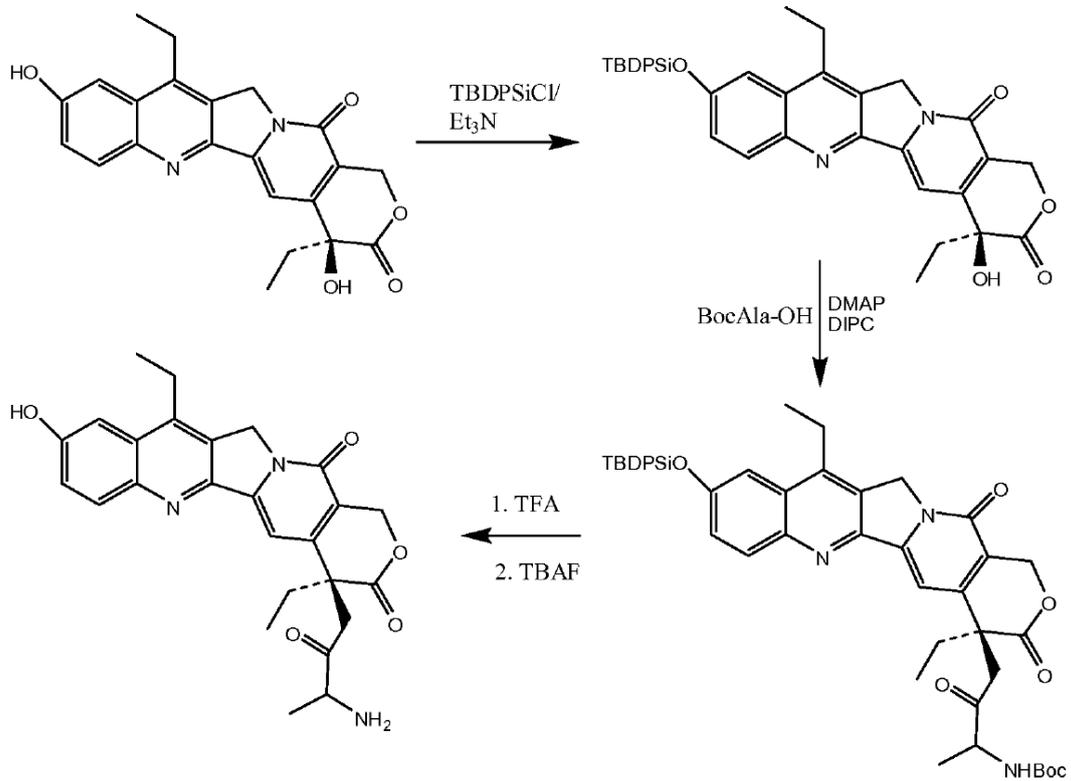
Esquema 2



El tratamiento del derivado de hidroxilo del alcaloide vinca con un t-éter que contiene amino protegido tal como el aminoácido esterificado con t-butoxi seguido de la hidrólisis con TFA del éster da la sal triflato del alcaloide vinca. (Esquema 2) La conjugación del alcaloide vinca con polímeros funcionalizados da como resultado conjugados de fármaco-polímero que pueden conjugarse adicionalmente con una PBRM o su derivado para dar como resultado conjugados de proteína-polímero-fármaco.

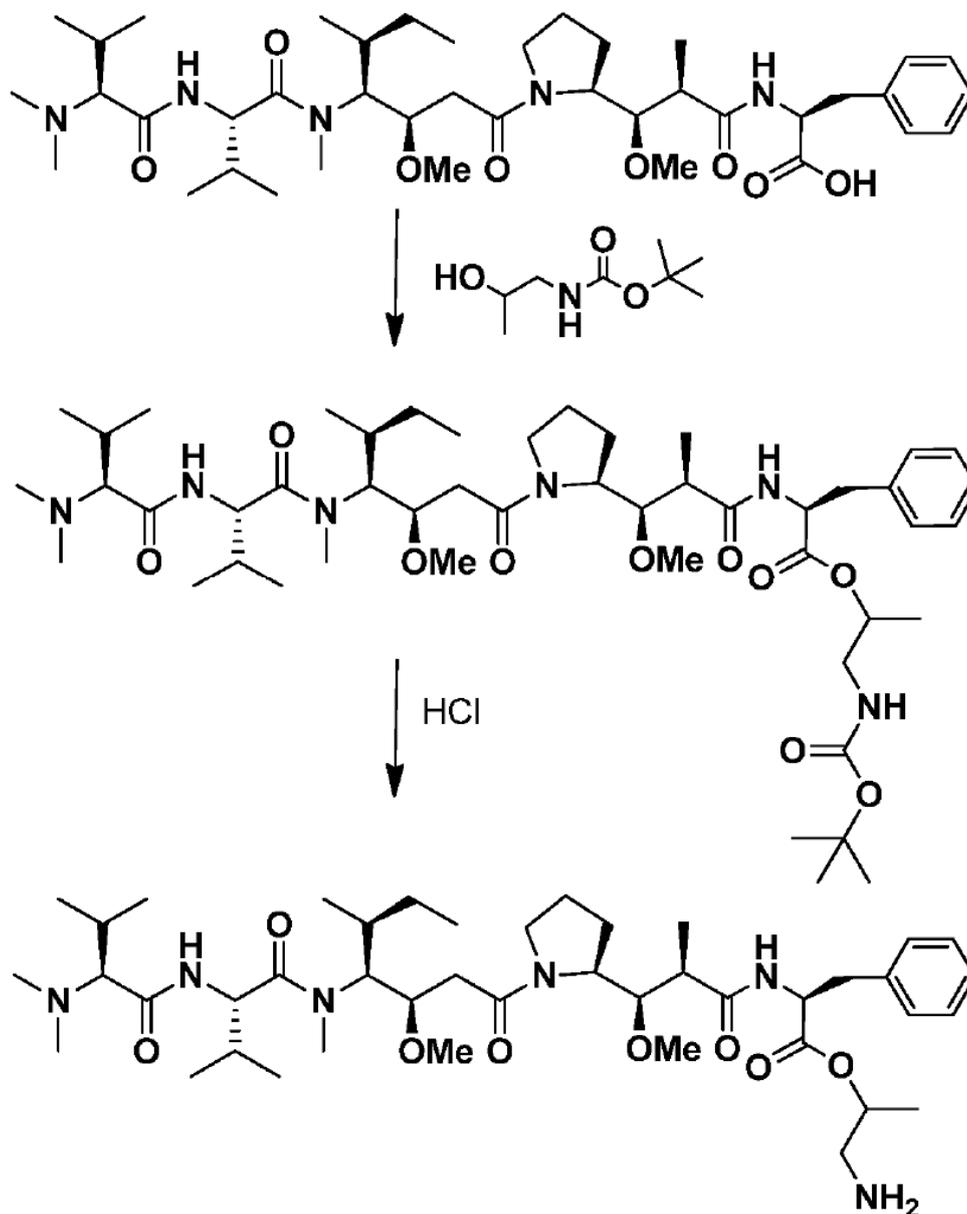
5

Esquema 3



- 5 El grupo 10-hidroxi del derivado de camptotecina no natural, por ejemplo, SN38, se protege selectivamente haciendo reaccionar el derivado con cloruro de tert-butildifenilsililo (TBDPSiCl) en presencia de trietilamina. El grupo 20-hidroxi se puede hacer reaccionar con t-butylcarbonil-alanina para formar el derivado de alanina usando el procedimiento descrito en Sapa, P. et al., Clin. Cancer Res., 14:1888-1896 (2008). Alternativamente, se pueden emplear otros aminoácidos, por ejemplo, glicina. La amina primaria se desenmascara eliminando el grupo protector Boc mediante tratamiento con ácido trifluoroacético, y luego eliminando el grupo protector TBDPS con fluoruro de tetrabutilamonio (véase el Esquema 3). El compuesto SN38 derivado de amino resultante se puede conjugar con un polímero funcionalizado para formar un conjugado de fármaco-polímero.

Esquema 4



5 El tratamiento de la auristatina F con un t-éter que contiene amino protegido tal como 2-hidroxipropil amina esterificada con t-butoxi seguida por hidrólisis con HCl del éster da el derivado de 2-hidroxilpropil amino de la auristatina F (véase Esquema 4). La conjugación del derivado de auristatina F con polímeros funcionalizados da como resultado conjugados de fármaco-polímero que pueden conjugarse adicionalmente con una PBRM o su derivado para dar como resultado conjugados de proteína-polímero-fármaco.

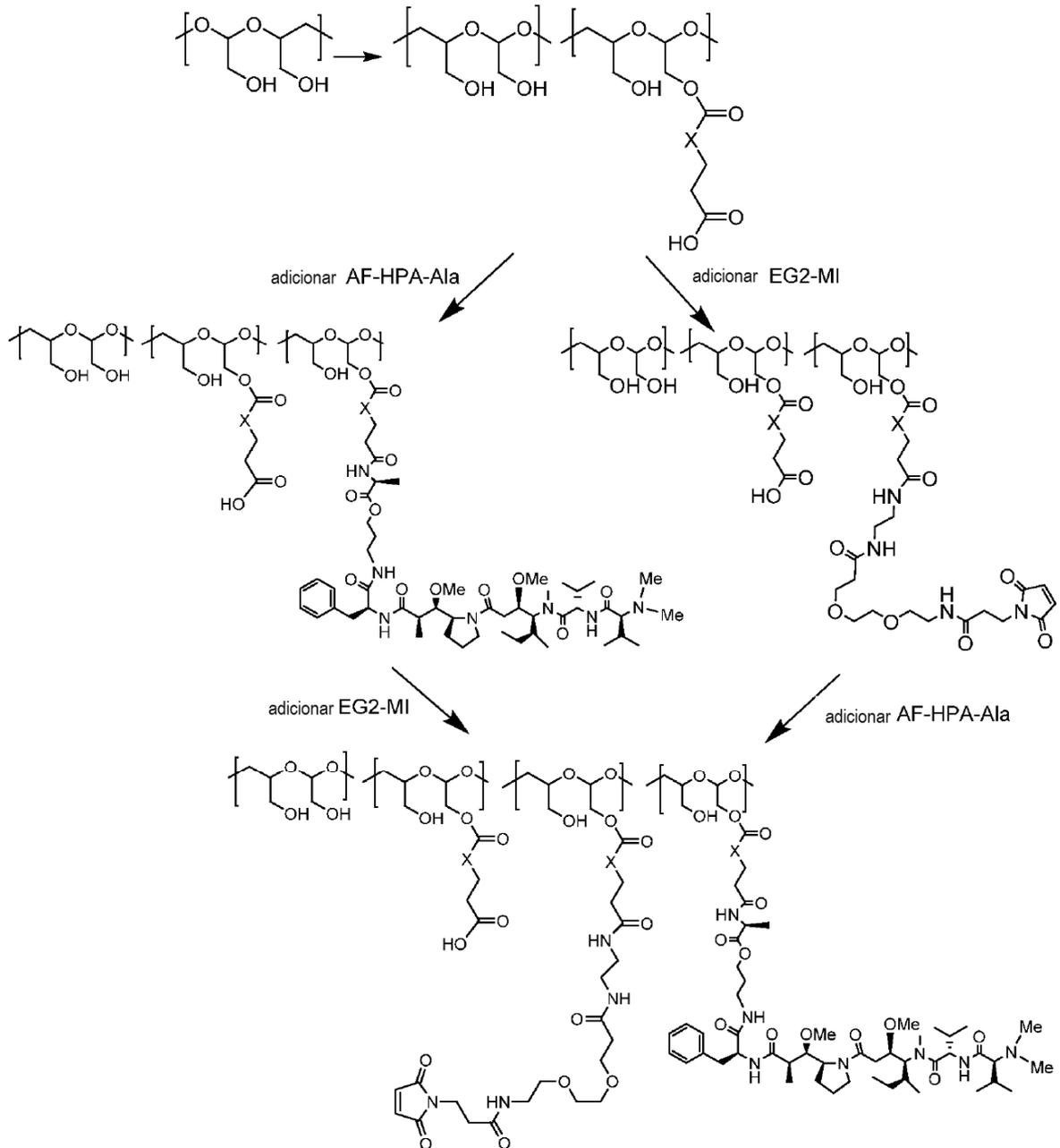
Conjugados o armazones poliméricos

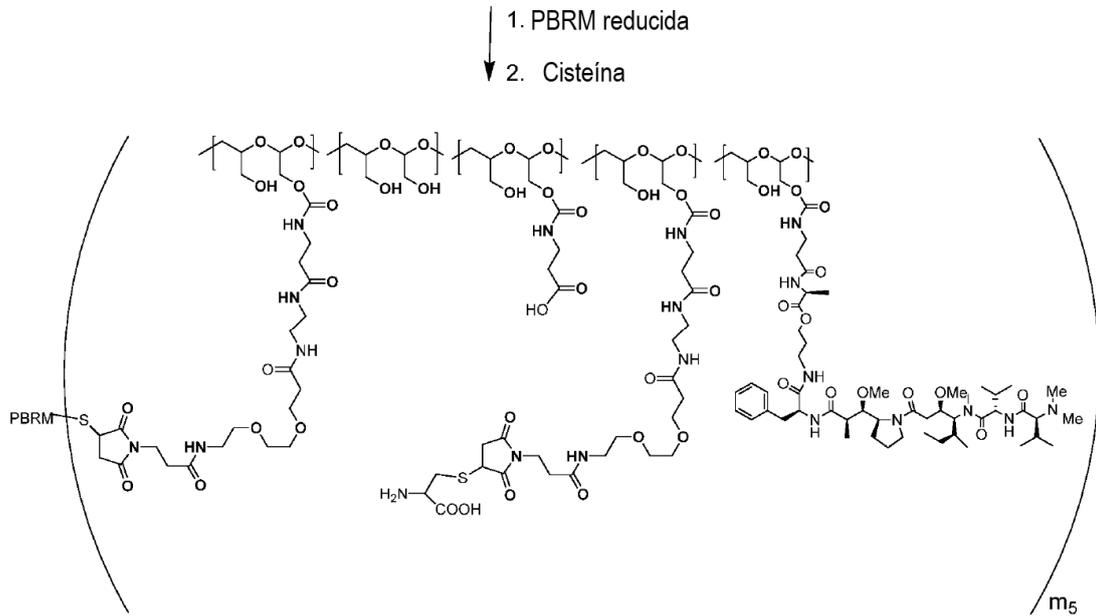
10 El esquema 5 a continuación muestra un esquema sintético para fabricar los armazones poliméricos de la invención. En un método, los conjugados se forman en varias etapas: (1) el polímero, PHF se modifica para contener una unidad estructural COOH (por ejemplo, $-C(O)-X-(CH_2)_2-COOH$); (2) el polímero se modifica entonces además para que contenga una unidad estructural maleimido (por ejemplo, EG2-MI) que pueda reaccionar con un grupo funcional de una PBRM; (3) el polímero modificado, que contiene dos grupos funcionales diferentes, se hace reaccionar con un

grupo funcional de un fármaco o su derivado (por ejemplo, AF-HPA-Ala) para formar un conjugado de polímero-fármaco; (4) se reducen los enlaces disulfuro de una PBRM; (5) la PBRM reducida se hace reaccionar luego con el conjugado de polímero-fármaco para formar el conjugado de proteína-polímero-fármaco; y (6) las unidades estructurales maleimido restantes se hacen reaccionar opcionalmente con un compuesto bloqueador de maleimido (por ejemplo, cisteína).

En otro método, el orden de las etapas (2) y (3) se puede invertir como se muestra en la ruta lateral derecha en el Esquema 5 a continuación.

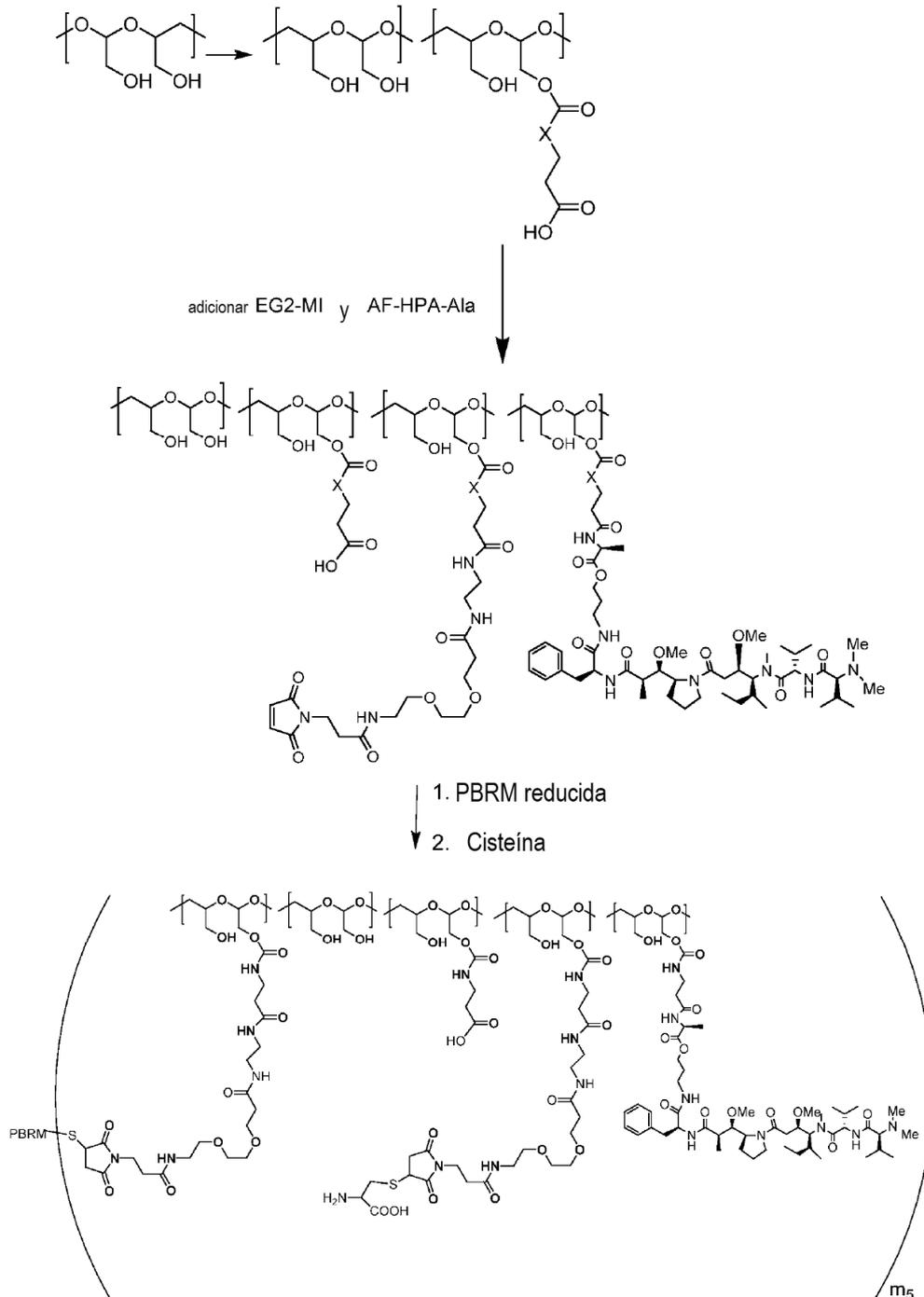
Esquema 5





En aún otro método, las etapas (2) y (3) anteriores se llevan a cabo simultáneamente como se representa en el Esquema 6 a continuación.

Esquema 6



Composiciones farmacéuticas

5 También se incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más conjugados de proteína-polímero-fármaco como se describe en el presente documento en un vehículo aceptable, tal como un estabilizador, regulador, y similares. Los conjugados pueden administrarse e introducirse en un sujeto por medios estándar, con o sin estabilizantes, reguladores, y similares, para formar una composición farmacéutica. La administración puede ser tópica

(incluida la oftálmica y las membranas mucosas, incluida la administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluso mediante un nebulizador; Inyección intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral, incluida la inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. Los conjugados pueden formularse y usarse como soluciones y/o suspensiones estériles para administración inyectable; polvos liofilizados para reconstitución antes de la inyección/infusión; composiciones tópicas; como tabletas, cápsulas o elixires para administración oral; o supositorios para administración rectal, y las otras composiciones conocidas en la técnica.

Una composición o formulación farmacológica se refiere a una composición o formulación en una forma adecuada para la administración, por ejemplo, administración sistémica, en una célula o sujeto, que incluye, por ejemplo, un humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada, por ejemplo, oral, inhalado, transdérmico o por inyección/infusión. Tales formas no deben impedir que la composición o formulación alcance una célula diana (es decir, una célula a la que el fármaco es deseable para el suministro). Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en el torrente sanguíneo deben ser solubles. Otros factores son conocidos en la técnica e incluyen consideraciones tales como toxicidad y formas que evitan que la composición o formulación ejerza su efecto.

Por "administración sistémica" se entiende la absorción o acumulación sistémica in vivo del polímero modificado en la corriente sanguínea, seguido de una distribución en todo el cuerpo. Las vías de administración que conducen a la absorción sistémica incluyen, sin limitación: intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, inhalación, oral, intrapulmonar e intramuscular. Cada una de estas rutas de administración expone los polímeros modificados a un tejido enfermo accesible. Se ha demostrado que la tasa de entrada de un agente activo en la circulación es una función del peso molecular o el tamaño. El uso de un conjugado de esta invención puede localizar el suministro de fármacos en ciertas células, tal como las células cancerosas a través de la especificidad de las PBRM.

Una "formulación farmacéuticamente aceptable" significa una composición o formulación que permite la distribución efectiva de los conjugados en la ubicación física más adecuada para su actividad deseada. En una realización, el suministro efectivo se produce antes de la eliminación por el sistema reticuloendotelial o la producción de una unión fuera del objetivo que puede dar como resultado una eficacia o toxicidad reducidas. Ejemplos no limitantes de agentes adecuados para la formulación con los conjugados incluyen: inhibidores de la glicoproteína P (tales como Pluronic P85), que pueden mejorar la entrada de agentes activos en el CNS; polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(DL-lactida-coglicólido) para el suministro de liberación sostenida después de la implantación intracerebral; y nanopartículas cargadas, tal como las que están hechas de polibutilcianoacrilato, que pueden suministrar agentes activos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal.

También se incluyen en este documento composiciones farmacéuticas preparadas para el almacenamiento o la administración, que incluyen una cantidad farmacéuticamente efectiva de los conjugados deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores, diluyentes y/o excipientes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, se pueden proporcionar reguladores, conservantes, agentes a granel, dispersantes, estabilizantes, colorantes. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. Ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) Solución salina regulada con fosfato de Dulbecco, pH de aproximadamente 6.5, que contendría de aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) solución salina al 0.9% (0.9% p/v de NaCl) y (3) dextrosa al 5% (p/v).

El término "cantidad farmacéuticamente efectiva", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición identificada, o para exhibir un efecto inhibitorio o terapéutico detectable. El efecto puede detectarse mediante cualquier método de ensayo conocido en la técnica. La cantidad efectiva precisa para un sujeto dependerá del peso corporal, el tamaño y la salud del sujeto; la naturaleza y extensión de la condición; y la terapéutica o combinación de terapias seleccionadas para la administración. Las cantidades farmacéuticamente efectivas para una situación dada pueden determinarse mediante la experimentación de rutina que está dentro de la habilidad y el criterio del médico. En un aspecto preferido, la enfermedad o condición puede tratarse mediante silenciamiento génico.

Para cualquier conjugado, la cantidad farmacéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular, por ejemplo, de células neoplásicas, o en modelos animales, generalmente ratas, ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el rango de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información se puede usar para determinar las dosis útiles y las vías de administración en humanos. La eficacia terapéutica/profiláctica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) y LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación, LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que exhiben grandes índices terapéuticos. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosis empleada, la sensibilidad del paciente y la ruta de administración.

Por ejemplo, un fármaco o sus derivados, conjugados de fármaco-polímero o conjugados de PBRM-polímero-fármaco pueden evaluarse por su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral en varias líneas celulares utilizando el Título de células Glo. Las curvas de respuesta a la dosis se pueden generar utilizando el software SoftMax Pro y los valores de

IC₅₀ se pueden determinar a partir de un ajuste de curva de cuatro parámetros. Las líneas celulares empleadas pueden incluir aquellas que son los objetivos de la PBRM y una línea celular de control que no es el objetivo de la PBRM contenida en los conjugados de prueba.

5 En una realización, los conjugados se formulan para administración parenteral mediante inyección, incluyendo el uso de técnicas de cateterización convencionales o infusión. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante agregado. Los conjugados pueden administrarse parenteralmente en un medio estéril. El conjugado, según el vehículo y la concentración utilizada, puede suspenderse o disolverse en el vehículo. Ventajosamente, los adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes reguladores pueden disolverse en el vehículo. El término "parenteral" como se usa en este documento incluye técnicas de inyección o infusión percutánea, subcutánea, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular o intratecal, y similares. Además, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende conjugados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Uno o más de los conjugados pueden estar presentes en asociación con uno o más vehículos y/o diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos y, si se desea, otros ingredientes activos.

15 La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico y parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear un aceite fijo insípido que incluye mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

20 Los conjugados y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse en forma apropiada, preferiblemente por vía parenteral, más preferiblemente por vía intravenosa. Para administración parenteral, los conjugados o composiciones pueden ser soluciones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Se puede utilizar propilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo, como disolvente o vehículo. Las composiciones también pueden contener adyuvantes, emulsionantes o dispersantes.

25 Los niveles de dosificación del orden de entre aproximadamente 0.001 mg y aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de las condiciones indicadas anteriormente (entre aproximadamente 0.05 mg y aproximadamente 7 g por sujeto por día). En algunas realizaciones, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0.001 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0.01 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosis administrada es de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosis administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosis administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. La cantidad de conjugado que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única varía según el huésped tratado y el modo particular de administración. Las formas unitarias de dosificación generalmente pueden contener entre aproximadamente 0.001 mg y aproximadamente 100 mg; entre aproximadamente 0.01 mg y aproximadamente 75 mg; o entre aproximadamente 0.01 mg y aproximadamente 50 mg; o entre aproximadamente 0.01 mg y aproximadamente 25 mg; de un conjugado.

45 Para la administración intravenosa, los niveles de dosificación pueden comprender los intervalos descritos en los párrafos anteriores, o de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 200 mg de un conjugado por kg de peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un conjugado por kg de peso corporal del animal. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el rango de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un compuesto.

50 En algunas realizaciones, los conjugados que se pueden administrar son los siguientes. Los conjugados pueden administrarse diariamente durante aproximadamente 5 días, ya sea como un bolus por día, durante aproximadamente 5 días, o como una infusión continua durante aproximadamente 5 días.

55 Alternativamente, los conjugados pueden administrarse una vez a la semana durante seis semanas o más. Como otra alternativa, los conjugados pueden administrarse una vez cada dos o tres semanas. Las dosis en bolus se administran en aproximadamente 50 a aproximadamente 400 ml de solución salina normal a la que se pueden agregar aproximadamente 5 a aproximadamente 10 ml de albúmina de suero humano. Las infusiones continuas se administran en aproximadamente 250 a aproximadamente 500 ml de solución salina normal, a la que se pueden agregar aproximadamente 25 a aproximadamente 50 ml de albúmina de suero humano, durante un período de 24 horas.

En algunas realizaciones, aproximadamente de una a aproximadamente cuatro semanas después del tratamiento, el paciente puede recibir un segundo tratamiento. El experto en la técnica puede determinar los protocolos clínicos

específicos con respecto a la ruta de administración, los excipientes, los diluyentes, las dosis y los tiempos, según lo justifique la situación clínica.

En otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva se puede proporcionar en otro horario regular, es decir, diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente o en un horario irregular con días, semanas, meses, etc., de administración variables. Alternativamente, la cantidad terapéuticamente efectiva para ser administrado puede variar. En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva para la primera dosis es mayor que la cantidad terapéuticamente efectiva para una o más de las dosis posteriores. En otra realización, la cantidad terapéuticamente efectiva para la primera dosis es menor que la cantidad terapéuticamente efectiva para una o más de las dosis posteriores. Se pueden administrar dosis equivalentes durante varios períodos de tiempo, que incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente cada 2 horas, aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 8 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 36 horas, aproximadamente cada 48 horas, aproximadamente cada 72 horas, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada dos semanas, aproximadamente cada tres semanas, aproximadamente cada mes y aproximadamente cada dos meses. El número y la frecuencia de las dosis correspondientes a un curso completo de terapia se determinarán de acuerdo con las recomendaciones de los organismos reguladores pertinentes y el juicio de un profesional de la salud. Las cantidades terapéuticamente efectivas descritas en este documento se refieren a cantidades totales administradas durante un período de tiempo dado; es decir, si se administra más de un conjugado diferente descrito aquí, las cantidades terapéuticamente efectivas corresponden a la cantidad total administrada. Se entiende que el nivel de dosis específico para un sujeto en particular depende de una variedad de factores que incluyen la actividad del conjugado específico, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de suministro. la excreción, la combinación con otros agentes activos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está sometiendo a la terapia.

Para la administración a animales no humanos, los conjugados también se pueden agregar al pienso para animales o al agua potable. Puede ser conveniente formular el pienso para animales y el agua potable para que el animal ingiera una cantidad terapéuticamente adecuada de los conjugados junto con su dieta. También puede ser conveniente presentar los conjugados como una premezcla para agregar al pienso o al agua potable.

Los conjugados también pueden administrarse a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico global. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos al tiempo que reduce la presencia de efectos secundarios. En alguna realización, los conjugados se usan en combinación con agentes quimioterapéuticos, tales como los descritos en la Patente U.S. No. 7,303,749. En otras realizaciones, los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a letrozol, oxaliplatino, docetaxel, 5-FU, lapatinib, capecitabina, leucovorina, erlotinib, pertuzumab, bevacizumab y gemcitabina. La presente invención también proporciona kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases llenos de uno o más de los conjugados y/o composiciones de la presente invención, que incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos. Tales kits también pueden incluir, por ejemplo, otros compuestos y/o composiciones, un dispositivo para administrar los compuestos y/o composiciones, e instrucciones escritas en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, o productos biológicos. Las composiciones descritas en el presente documento pueden envasarse como una dosis única o para administración discontinua continua o periódica. Para la administración continua, un paquete o kit puede incluir los conjugados en cada unidad de dosificación (por ejemplo, solución u otra unidad descrita anteriormente o utilizada en el suministro de fármacos), y opcionalmente instrucciones para administrar las dosis diariamente, semanalmente o mensualmente, para una duración predeterminada de tiempo o según lo prescrito. Si se desean concentraciones variables de una composición, de los componentes de la composición, o las relaciones relativas de los conjugados o agentes dentro de una composición a lo largo del tiempo, un paquete o kit puede contener una secuencia de unidades de dosificación que proporcione la variabilidad deseada.

Se conocen varios paquetes o kits en la técnica para dispensar agentes farmacéuticos para uso oral periódico. En una realización, el paquete tiene indicadores para cada período. En otra realización, el paquete es un paquete de tipo blíster etiquetado, paquete de dispensador de dial o botella. Los medios de empaque de un kit pueden estar preparados para su administración, tal como una jeringa, pipeta, cuentagotas u otro aparato similar, desde el cual la formulación puede aplicarse a un área afectada del cuerpo, inyectada en un sujeto, o incluso aplicado y mezclado con los otros componentes del kit.

Métodos de uso

Métodos de tratamiento

En ciertas realizaciones preferidas de la invención, el conjugado de proteína-polímero-fármaco de la invención son para uso en métodos de tratamiento de animales (preferiblemente mamíferos, lo más preferiblemente humanos e incluye machos, hembras, bebés, niños y adultos). En una realización, los conjugados de la presente invención pueden ser para uso en un método para tratar animales que comprende administrar al animal un conjugado biocompatible biodegradable de la invención. Por ejemplo, los conjugados de acuerdo con la invención se pueden administrar en forma de polímeros lineales solubles, copolímeros, conjugados, coloides, partículas, geles, elementos sólidos, fibras, películas, etc. Los conjugados biocompatibles biodegradables de esta invención se pueden usar como fármaco

portadores y componentes de portadores de fármacos, en sistemas de liberación controlada de fármacos, preparaciones para procedimientos quirúrgicos poco invasivos, etc. Las formulaciones farmacéuticas pueden ser inyectables, implantables, etc.

- 5 En aún otro aspecto, la invención proporciona al menos un conjugado de la invención para uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno neoplásico en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de al menos uno de dichos conjugados de la invención; en donde dicho conjugado libera uno o más agentes terapéuticos tras la biodegradación.

10 En otra realización, los conjugados pueden administrarse in vitro, in vivo y/o ex vivo para tratar pacientes y/o para modular el crecimiento de poblaciones de células seleccionadas que incluyen, por ejemplo, cáncer. En algunas realizaciones, los tipos particulares de cánceres que pueden tratarse con los conjugados incluyen, pero no se limitan a: (1) tumores sólidos, que incluyen, pero no se limitan a fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma, astrocitoma multiforme, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma; (2) cánceres de origen sanguíneo, que incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda "ALL", leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia mieloblástica aguda "AML", leucemia promielocítica aguda "APL", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia no diferenciada aguda, leucemia mielocítica crónica "CML", leucemia linfocítica crónica "CLL", leucemia de células pilosas, mieloma múltiple, leucemias agudas y crónicas, por ejemplo, leucemias mielocíticas linfoblásticas y mielocíticas linfocíticas; y (3) linfomas tales como la enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada y la policitemia vera.

15 En otra disposición, los conjugados pueden administrarse in vitro, in vivo y/o ex vivo para tratar pacientes y/o para modular el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas en pacientes con anal, astrocitoma, leucemia, linfoma, cabeza y cuello, hígado, testicular, cervical sarcoma, hemangioma, esófago, ojo, laringe, boca, mesotelioma, piel, mieloma, oral, rectal, garganta, vejiga, mama, útero, ovario, próstata, pulmón, colon, páncreas, riñón o cáncer gástrico.

- 35 En otra disposición, los cánceres se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de ovario.

40 En otra disposición, los conjugados pueden administrarse in vitro, in vivo y/o ex vivo para tratar, prevenir, reducir el riesgo de desarrollar y/o retrasar la presencia de ciertas patologías, por ejemplo, un cáncer. Por ejemplo, los conjugados de la invención son útiles para tratar, prevenir, retrasar la progresión o, de otro modo, mejorar un síntoma de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer anal, astrocitoma, leucemia, linfoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer testicular, cáncer cervical, sarcoma, hemangioma, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de laringe, cáncer de boca, mesotelioma, cáncer de piel, mieloma, cáncer oral, cáncer de recto, cáncer de garganta, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer renal y cáncer gástrico.

45 En otra situación prevista, los conjugados pueden administrarse in vitro, in vivo y/o ex vivo para tratar enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide, psoriasis y esclerosis múltiple; rechazo de injertos, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra huésped; infecciones virales, tales como infección por CMV, infección por VIH y SIDA; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y similares.

50 En ciertas disposiciones, los conjugados también pueden usarse para la fabricación de un medicamento útil para tratar o disminuir la gravedad de los trastornos, tales como, caracterizados por un crecimiento anormal de células (por ejemplo, cáncer).

- 55 En ciertas realizaciones, el agente terapéutico se administra localmente a una célula, tejido u órgano objetivo específico.

En ciertas realizaciones, al practicar el método descrito aquí, el conjugado comprende además o está asociado con un marcador de diagnóstico. En ciertas realizaciones de ejemplo, el marcador de diagnóstico se selecciona del grupo

- que consiste en: isótopos radiofarmacéuticos o radioactivos para centillografía gamma y PET, agente de contraste para imágenes de resonancia magnética (IRM), agente de contraste para tomografía computada, agente de contraste para el método de imágenes de rayos X, agente para el método de diagnóstico por ultrasonido, agente para la activación de neutrones, unidad estructural que puede reflejar, dispersar o afectar a los rayos X, ultrasonidos, ondas de radio y microondas y fluoróforos. En ciertas realizaciones de ejemplo, el conjugado se monitoriza adicionalmente in vivo.
- Ejemplos de marcadores de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, radiofármacos de diagnóstico o isótopos radiactivos para centillografía gamma y PET, agente de contraste para imágenes de resonancia magnética (IRM) (por ejemplo, átomos paramagnéticos y nanocristales superparamagnéticos), agente de contraste para tomografía computada, agente de contraste para el método de imagen de rayos X agente para el método de diagnóstico por ultrasonido, agente para la activación de neutrones y la unidad estructural que puede reflejar, dispersar o afectar a los rayos X, ultrasonidos, ondas de radio y microondas, fluoróforos en diversos procedimientos ópticos, etc. Los radiofármacos de diagnóstico incluyen radionúclidos emisores γ , por ejemplo, indio 111, tecnecio-99m y yodo-131, etc. Los agentes de contraste para IRM (Imágenes de Resonancia Magnética) incluyen compuestos magnéticos, por ejemplo, iones paramagnéticos, hierro, manganeso, gadolinio, lantánidos, unidades estructurales paramagnéticas orgánicas y compuestos superparamagnéticos, ferromagnéticos y antiferromagnéticos, por ejemplo, coloides de óxido de hierro, coloides de ferrita, etc. Agentes de contraste para tomografía computada y otros métodos de imágenes basados en rayos X incluyen compuestos que absorben rayos X, por ejemplo, yodo, bario. Los agentes de contraste para los métodos basados en ultrasonido incluyen compuestos que pueden absorber, reflejar y dispersar ondas de ultrasonido, por ejemplo, emulsiones, cristales, burbujas de gas, etc. Otros ejemplos incluyen sustancias útiles para la activación de neutrones, tales como el boro y el gadolinio. Además, se pueden emplear marcadores que pueden reflejar, refractar, dispersar o afectar a rayos X, ultrasonido, ondas de radio, microondas y otros rayos útiles en procedimientos de diagnóstico. Los marcadores fluorescentes se pueden utilizar para la fotoimagen. En ciertas realizaciones, un modificador comprende un ion o grupo paramagnético.
- También se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende preparar una formulación acuosa de al menos un conjugado de la invención e inyectar parenteralmente dicha formulación en el sujeto.
- Previsto adicionalmente en el presente documento un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende preparar un implante que comprende al menos un conjugado de la invención e implantar dicho implante en el sujeto. En ciertas realizaciones de ejemplo, el implante es una matriz de gel biodegradable.
- Es adicionalmente todavía previsto en el presente documento un método para tratar un animal que lo necesite, que comprende administrar un conjugado de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.
- También se proporciona un método para provocar una respuesta inmune en un animal, que comprende administrar un conjugado como en los métodos descritos anteriormente.
- También se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad en un animal, que comprende las etapas de:
- administrar un conjugado como en los métodos descritos anteriormente, en donde dicho conjugado comprende una molécula detectable; y
- detectar la molécula detectable.
- En ciertas disposiciones de ejemplo, la etapa de detección de la molécula detectable se realiza de manera no invasiva. En ciertas disposiciones de ejemplo, la etapa de detección de la molécula detectable se realiza utilizando un equipo de formación de imágenes adecuado.
- También se proporciona, un método para tratar un animal comprende administrar al animal un conjugado biocompatible biodegradable de la invención como un empaque para una herida quirúrgica de la que se ha eliminado un tumor o crecimiento. El empaque de conjugado biocompatible biodegradable reemplazará el sitio del tumor durante la recuperación y se degradará y disipará a medida que la herida se cure.
- En ciertas disposiciones, el conjugado está asociado con un marcador de diagnóstico para la monitorización in vivo.
- Los conjugados descritos anteriormente se pueden usar para el tratamiento terapéutico, preventivo y analítico (diagnóstico) de animales. Los conjugados están destinados, en general, a la administración parenteral, pero en algunos casos pueden administrarse por otras vías.
- En una disposición, los conjugados solubles o coloidales se administran por vía intravenosa. En otra realización, los conjugados solubles o coloidales se administran mediante inyección local (por ejemplo, subcutánea, intramuscular). En otra realización, los conjugados sólidos (por ejemplo, partículas, implantes, sistemas de suministro de fármacos) se administran a través de la implantación o inyección.

En otra disposición, los conjugados que comprenden un marcador detectable se administran para estudiar los patrones y la dinámica de la distribución del marcador en el cuerpo del animal.

5 En ciertas disposiciones, se puede usar uno cualquiera o más de los conjugados divulgados en el presente documento para practicar cualquiera de los métodos descritos anteriormente. En ciertas disposiciones de ejemplo, el conjugado es un conjugado de Trastuzumab-PHF-, Rituximab-PHF-, Lintuzumab-PHF o anti-5T4-PHF-fármaco.

10 A lo largo de la descripción, cuando se describe que las composiciones tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, se contempla que las composiciones también consistan esencialmente en, o consisten en, los componentes citados. De manera similar, cuando los métodos o procesos se describen como que tienen, que incluyen o comprenden etapas de proceso específicas, los procesos también consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento citadas. Además, debe entenderse que el orden de las etapas u orden para realizar ciertas acciones es irrelevante siempre y cuando la invención permanezca operativa. Además, dos o más etapas o acciones pueden llevarse a cabo simultáneamente.

15 Los procesos sintéticos descritos aquí pueden tolerar una amplia variedad de grupos funcionales; por lo tanto, pueden usarse diversos materiales de partida sustituidos. Los procesos generalmente proporcionan el compuesto final deseado en o cerca del final del proceso global, aunque en ciertos casos puede ser deseable convertir además el compuesto en una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Los compuestos farmacológicos utilizados para los conjugados de la presente invención se pueden preparar de diversas maneras utilizando materiales de partida disponibles comercialmente, compuestos conocidos en la literatura o a partir de productos intermedios fácilmente preparados, empleando métodos y procedimientos sintéticos estándar conocidos por los expertos en la técnica, o que será evidente para el experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de este documento. Los métodos y procedimientos sintéticos estándar para la preparación de moléculas orgánicas y las transformaciones y manipulaciones de grupos funcionales se pueden obtener de la literatura científica relevante o de los libros de texto estándar en el campo. Aunque no se limita a ninguna o varias fuentes, textos clásicos tales como S Smith, M. B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition, John Wiley & Sons: New York, 2001; y Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999 son libros de referencia de síntesis orgánica útiles y reconocidos que conocen los expertos en la técnica. Las siguientes descripciones de métodos sintéticos están diseñadas para ilustrar, pero no para limitar, los procedimientos generales para la preparación de compuestos de la presente invención.

30 Los conjugados de la presente invención y los compuestos farmacológicos incluidos en la misma pueden prepararse convenientemente mediante una variedad de métodos familiares para los expertos en la técnica. Los conjugados o compuestos de esta invención con cada una de las fórmulas descritas en el presente documento pueden prepararse de acuerdo con los siguientes procedimientos a partir de materiales de partida disponibles comercialmente o materiales de partida que pueden prepararse usando procedimientos de la bibliografía. Estos procedimientos muestran la preparación de conjugados representativos de esta invención.

35 Los conjugados diseñados, seleccionados y/u optimizados por los métodos descritos anteriormente, una vez producidos, pueden caracterizarse utilizando una variedad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica para determinar si los conjugados tienen actividad biológica. Por ejemplo, los conjugados pueden caracterizarse por ensayos convencionales, incluidos, pero no limitados a los ensayos descritos a continuación, para determinar si tienen una actividad predicha, actividad de unión y/o especificidad de unión.

40 Adicionalmente, se puede utilizar la selección de alto rendimiento para acelerar el análisis utilizando tales ensayos. Como resultado, puede ser posible rastrear rápidamente las moléculas conjugadas descritas en el presente documento para determinar su actividad, utilizando técnicas conocidas en el arte. Las metodologías generales para realizar el cribado de alto rendimiento se describen, por ejemplo, en Devlin (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; y la patente U.S. No. 5,763,263. Los ensayos de alto rendimiento pueden utilizar una o más técnicas de ensayo diferentes, incluidas, pero no limitadas a, las que se describen a continuación.

50 La cita de publicaciones y documentos de patente no pretende ser una admisión de ninguna técnica anterior pertinente, ni constituye una admisión en cuanto al contenido o la fecha de la misma. Habiéndose descrito la invención a modo de descripción escrita, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede poner en práctica en una variedad de realizaciones y que la descripción anterior y los ejemplos a continuación tienen el propósito de ilustrar y no limitar las reivindicaciones que siguen.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos de trabajo son ilustrativos de los enlazadores, moléculas de fármacos y PBRM, y los métodos para prepararlos.

55 Los conjugados descritos en el presente documento pueden prepararse mediante los esquemas generalmente descritos anteriormente y mediante los métodos descritos en los ejemplos a continuación. El término "contenido" tal como se usa en ciertos ejemplos a continuación, a menos que se especifique otra cosa, significa la fracción molar o el porcentaje molar de las unidades estructurales del polímero que están sustituidas con la unidad estructural deseada,

tal como el enlazador, la molécula de fármaco o PBRM. Por consiguiente, los porcentajes informados para las diversas unidades de polímero en los conjugados polímero-fármaco o PBRM-polímero-fármaco como se usan en los Ejemplos a continuación son porcentajes molares, a menos que se especifique otra cosa. Téngase en cuenta que los conjugados que quedan fuera del alcance de las reivindicaciones se proporcionan con fines informativos como ejemplos de referencia.

5

Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se utilizan en los esquemas de reacción y los ejemplos sintéticos, que siguen. Esta lista no pretende ser una lista exhaustiva de abreviaturas utilizadas en la solicitud como abreviaturas estándar adicionales, que los expertos en la técnica de la síntesis orgánica entienden fácilmente, también pueden usarse en los esquemas y ejemplos sintéticos.

10

ACN Acetonitrilo

AF-HPA Auristatina F-hidroxiopropilamida

Ala Alanina

BA β -Alanina

15

BOC tert-Butiloxicarbonilo

DCC N,N'-Diciclohexilcarbodiimid

DCM DiClorometano

DIEA N,N-Diisopropiletilamina

DMA Dimetilacetamida

20

DMAP N,N-Dimetilpiridin-4-amina

DMF Dimetilformamida

DMSO Dimetilsulfóxido

EDAC Clorhidrato de N1-((etilimino)metilen)-N3,N3-dimetilpropano-1,3-diamina

EDC.HCl Clorhidrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida

25

GA Ácido glutárico

HIC-HPLC Cromatografía líquida de alta presión de interacción hidrófoba

HOAt 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol

HOBt hidrato de 1-Hidroxibenzotriazol

HPLC Cromatografía líquida de alta presión

30

HPSEQ Cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento.

HPV Hidroxipropilvindesina

2HPV 2- Hidroxipropilvindesina

MWCO Corte de peso molecular

NHS 1-Hidroxipirrolidin-2,5-diona (es decir, N-hidroxi-succinimida)

35

NMP N-metil-2-pirrolidona

PBS Solución salina regulada con fosfato, 0.9 % NaCl

EG Etilén glicol

EG2 Dietilén glicol

MI Maleimida o maleimido

40

HPA-Ala Hidroxipropilamida-L-alanina

PHF poly(1-hidroximetiletilen hidroxilmetilformal), o FLEXIMER®

RP-HPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa

SEQ Cromatografía de exclusión de tamaño

TBSCI Cloruro de tert-butildimetilsilil éter

5 TCEP Tris[2-carboxietil] fosfina

TEA Trietilamina

TEAA Acetato de Trietilamonio

TFA Ácido trifluoroacético

WCX Cromatografía de intercambio catiónico débil.

10 Información general

El éster maleimido-EG2-NHS se adquirió de Biomatrik, China.

HCl de Boc-diaminoetano se adquirió de Chem-Impex International Inc., Wood Dale, IL.

Se adquirió Kadcyla® (ado-trastuzumab emtansine) para inyección fabricada por Genentech.

15 La purificación por HPLC se realizó en una columna de semipreparación Phenomenex Gemini 5 µm 110 Å, 250 x 10 mm, 5 micras.

La SEQ se realizó en una columna Tosoh Biosciences TSK gel G5000 (7,8 mm x 30 cm, 10 µm) o una columna Superose 12 (GE Healthcare).

WCX se realizó en la columna ProPac WCX-10 (94 mm x 250 mm) (ThermoFisher).

20 Siempre que fue posible, el contenido de fármaco de los conjugados se determinó espectrofotométricamente, por otra parte, se realizó LC/MS o ¹H-RMN para la determinación cuantitativa del contenido de fármaco.

El contenido de proteína de los conjugados de proteína-polímero-fármaco se determinó espectrofotométricamente a 280 nm o mediante ELISA.

25 Los pesos moleculares de los conjugados de polímeros (informados como los pesos moleculares promedio aparentes en peso o los pesos moleculares máximos) se determinaron por SEQ con polisacáridos o estándares de peso molecular de proteínas. Más específicamente, para el polímero o conjugados polímero-fármaco, se utilizaron estándares de pesos moleculares de polisacáridos, y para conjugados de proteína-fármaco-polímero, se utilizan estándares de proteínas. A menos que se indique específicamente, el peso molecular del portador de polímero informado es el peso molecular promedio en peso de PHF; y el peso molecular del conjugado de polímero-fármaco y los conjugados de proteína-polímero-fármaco es el peso molecular máximo. Los conjugados de PBRM-polímero-fármaco tienen un peso molecular máximo de aproximadamente 160 kDa a aproximadamente 260 kDa. Los conjugados de polímero y polímero sintetizados/medidos tienen típicamente una polidispersidad ≤1.5.

30 Los conjugados de PBRM-polímero-fármaco se separaron de los conjugados de fármaco-polímero residual sin reaccionar mediante diafiltración extensa. Si fue necesario, se realizó una purificación adicional mediante cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía WCX para eliminar cualquier conjugado de PBRM-polímero-fármaco agregado. En general, los conjugados de PBRM-polímero-fármaco típicamente contenían <5% (p/p, por ejemplo, <2% p/p) de fracción agregada según lo determinado por SEQ; <0.5% (p/p, por ejemplo, <0.1% p/p) de fármaco libre (no conjugado) según lo determinado por RP-HPLC o LC-MS/MS; <1% (p/p) de conjugado de polímero-fármaco libre según lo determinado por SEQ y/o RP-HPLC y <2% (p/p, por ejemplo, <1% p/p) PBRM no conjugado según lo determinado por HIC-HPLC y/o WCX HPLC. Los anticuerpos reducidos o parcialmente reducidos se prepararon utilizando los procedimientos descritos en la literatura, véase, por ejemplo, Francisco et al., Blood 102 (4): 1458-1465 (2003). La concentración total de fármaco (conjugada y no conjugada) se determinó mediante LC-MS/MS;

35 Para estudiar las propiedades farmacocinéticas, es decir, el curso del tiempo de la absorción, distribución, metabolismo y excreción del conjugado de PBRM-polímero-fármaco, se desarrollaron ensayos para medir la concentración del conjugado de PBRM-PHF-AF-HPA (es decir, el AF-HPA conjugado) y la concentración de AF-HPA y AF (fármaco libre) no conjugado liberado en, por ejemplo, plasma, tumor y muestras de tejido. Para determinar la concentración del fármaco libre en la muestra, la muestra acidificada se trató con acetonitrilo. El fármaco libre se extrajo del sobrenadante y se analizó por LC-MS/MS. Para determinar la concentración de AF-HPA conjugado, el plasma acidificado, el tumor o el homogeneizado de tejido se sometió a hidrólisis básica seguida de acidificación y precipitación de proteínas con acetonitrilo. El sobrenadante de acetonitrilo que contiene el AF-HPA y AF liberados se analizó mediante LC-MS/MS.

40 Las curvas estándar para el fármaco libre y el AF-HPA conjugado en plasma y homogeneizados de tumores y tejidos

fueron lineales en los rangos de concentración de 0.3 a 3.000 ng/mL y 10 a 20.000 ng/mL, respectivamente. La concentración total de trastuzumab se determinó mediante ELISA.

En todos los experimentos in vitro o in vivo descritos en el presente documento, a menos que se especifique otra cosa, las dosis utilizadas se basaron todas en la PBRM (por ejemplo, anticuerpo) de los conjugados de PBRM-polímero-fármaco.

RP-HPLC, SDS-PAGE o electroforesis capilar se utilizaron para caracterizar la especificidad y distribución de los sitios de bioconjugación de cisteína en los conjugados de PBRM-polímero-fármaco. Los resultados dieron la distribución posicional de los conjugados de fármaco-polímero en las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de la PBRM y mostraron que la conjugación con la PBRM se producía predominantemente en las regiones bisagras de cisteína intercatenadas de cadena pesada. Se obtuvieron resultados similares con los mapas de péptidos LC-MS PBRM.

Procedimientos generales

Procedimiento general A. Conjugación de polímero con enlazador o fármaco.

En general, la conjugación del polímero (PHF-BA o PHF-GA) con un enlazador que contiene amina, tal como, por ejemplo, EG2-maleimida o un fármaco enlazador que contiene amina, como, por ejemplo, AF-HPA-Ala, HPV-Ala, se realiza en una mezcla de solventes acuosos u orgánicos al 10-90% en presencia de un agente activador, como por ejemplo EDC.HCl. Los disolventes orgánicos típicos incluyen, pero no se limitan a, disolventes miscibles con agua, tales como, por ejemplo, DMSO, DMF, DMA, NMP y ACN. Para acelerar el acoplamiento, se agrega un coactivador, tal como, por ejemplo, NHS. El polímero se mezcla primero con el compuesto que contiene amino, seguido de la adición del coactivador (NHS) y luego la adición del activador (EDC.HCl). La reacción se realiza a 0-10 °C, pH 4.5 a 7.5 durante 1 hora a 24 horas a temperatura ambiente. El producto conjugado de polímero resultante se purifica por diafiltración o por SEQ. El producto se concentra a 2-50 mg/ml, el pH se ajusta a 4.5 a 6.5 para asegurar la estabilidad del enlazador del fármaco-polímero y el conjugado se almacena congelado a una temperatura de -20 a -80 °C hasta su uso posterior.

La conjugación del polímero con el enlazador o fármaco que contiene amina se puede llevar a cabo de forma secuencial, en cualquier orden o simultáneamente.

Procedimiento general B. Reducción selectiva parcial de proteínas (PBRM)

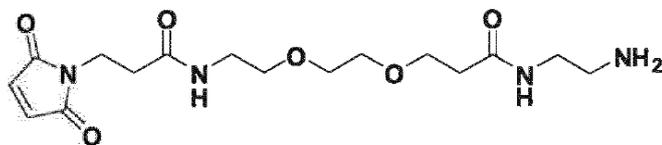
La reducción selectiva parcial de los grupos disulfuro inter-cadena o disulfuro no pareado en la PBRM relevante antes de la conjugación con el conjugado de polímero-fármaco se logra usando un agente reductor, tal como, por ejemplo, TCEP, DTT o β -mercaptoetanol. Cuando la reducción se realiza con un exceso del agente reductor, el agente reductor se elimina antes de la conjugación con SEQ. El grado de conversión de los grupos disulfuro PBRM en grupos sulfhidrilo reactivos depende de la estequiometría de PBRM, agente reductor, pH, temperatura y/o duración de la reacción. Cuando se reducen algunos pero no todos los grupos disulfuro en la PBRM, la PBRM reducida es una PBRM parcialmente reducida.

Procedimiento general C. Conjugación de PBRM parcialmente reducida con conjugado de polímero fármaco

La conjugación de la PBRM parcialmente reducida al conjugado de polímero-fármaco se realiza bajo condiciones neutras o ligeramente básicas (pH 6.5-8.5) a concentraciones de PBRM de 1-10 mg/ml y concentraciones de conjugado de polímero-fármaco de 0.5-10 mg/ml. El conjugado de polímero-fármaco se usa típicamente en 1-5.0 veces en exceso con respecto a la estequiometría deseada de conjugado de proteína-polímero-fármaco. Cuando la PBRM se conjuga con el grupo maleimido del conjugado de polímero-fármaco, la conjugación se termina opcionalmente mediante la adición de un compuesto bloqueador de maleimido soluble en agua, tal como, por ejemplo, N-acetil cisteína, metil éster cisteína, N-metil cisteína, 2-mercaptoetanol, ácido 3-mercaptopropanoico, ácido 2-mercaptoacético, mercaptometanol (es decir, HOCH₂SH), bencil tiol, y similares.

El conjugado de PBRM-polímero-fármaco resultante se purifica típicamente mediante diafiltración para eliminar cualquier conjugado de polímero-fármaco no conjugado, fármaco no conjugado e impurezas de molécula pequeña. Alternativa o adicionalmente, procedimientos de separación cromatográfica apropiados tales como, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de iones, tal como, por ejemplo, cromatografía de WCX; cromatografía de fase reversa, cromatografía de hidroxil apatito, cromatografía de afinidad o sus combinaciones pueden usarse para purificar el conjugado de PBRM-polímero-fármaco. El conjugado de PBRM-polímero-fármaco purificado resultante se formula típicamente en un regulador a pH 5.0-6.5.

Ejemplo 1. Síntesis de EG2-maleimida: (O-[N-(3-maleimidopropionil)aminoetil]-O'-[3-(N-(2-aminoetil)amino)-3-oxopropil]etilenglicol)



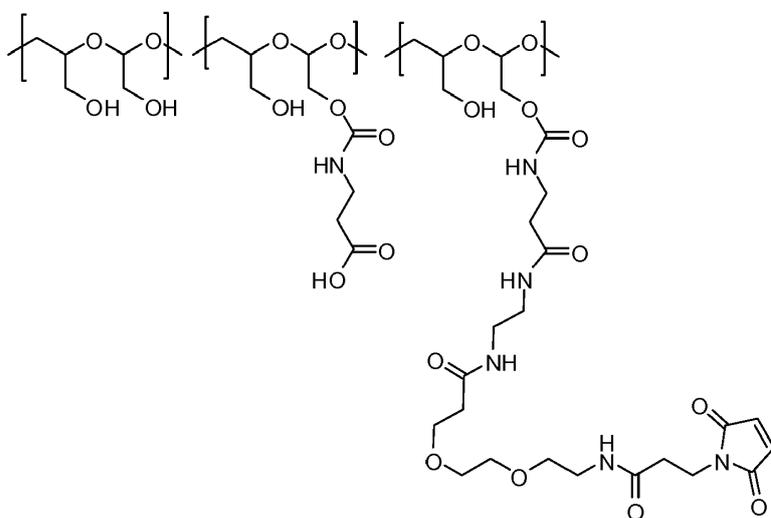
("EG2-maleimida" o "EG2-MI")

5 A una suspensión helada de éster de maleimido-EG2-NHS (O-[N-(3-maleimidopropionil)aminoetil]-O'-[3-(N-succinimidiloxi)-3-oxopropil] etilenglicol, 1.2 g, 2.82 mmol) y clorhidrato de Boc-diaminoetano (560 mg, 2.82 mmol) en ACN (15 ml) se añadió TEA gota a gota (0.571 g, 5.64 mmol) mientras se agitaba. La mezcla resultante se llevó hasta temperatura ambiente y la agitación continuó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió clorhidrato de BOC-diaminoetano adicional (110 mg) para completar la reacción. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó en RP-HPLC (0-100% de ACN en agua) para dar Boc-diaminoetano-EG2-maleimida en forma de un sólido incoloro (1.18 g, 89% de rendimiento). ESI MS: calculado $C_{21}H_{35}N_4O_8[M+H^+]$ 471.3; encontrado 471.2.

10 La Boc-diaminoetano-EG2-maleimida (1.18 g, 2.508 mmol) se disolvió en una solución de TFA al 30% en DCM (20 ml) a 0 °C, la solución resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción cruda se concentró al vacío y luego se purificó en RP-HPLC (ACN al 0-10% en agua que contenía TFA al 0.1%) para proporcionar el compuesto del título (EG2-maleimida) en forma de un aceite incoloro (1.04 g, 86%).

15 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6+D_2O): δ 6.95 (s, 2 H), 3.66-3.54 (m, 10 H), 3.34 (t, 2 H, $J = 5.6$ Hz), 3.27 (t, 2 H, $J = 6.7$ Hz), 3.18-3.10 (m, 2 H), 2.84 (t, 2 H, $J = 6.2$ Hz), 2.33 (q, 4 H, $J = 6.7$ Hz); ESI MS: calculado para $C_{16}H_{27}N_4O_6 [M+H^+]$ 371.2; encontrado 371.2.

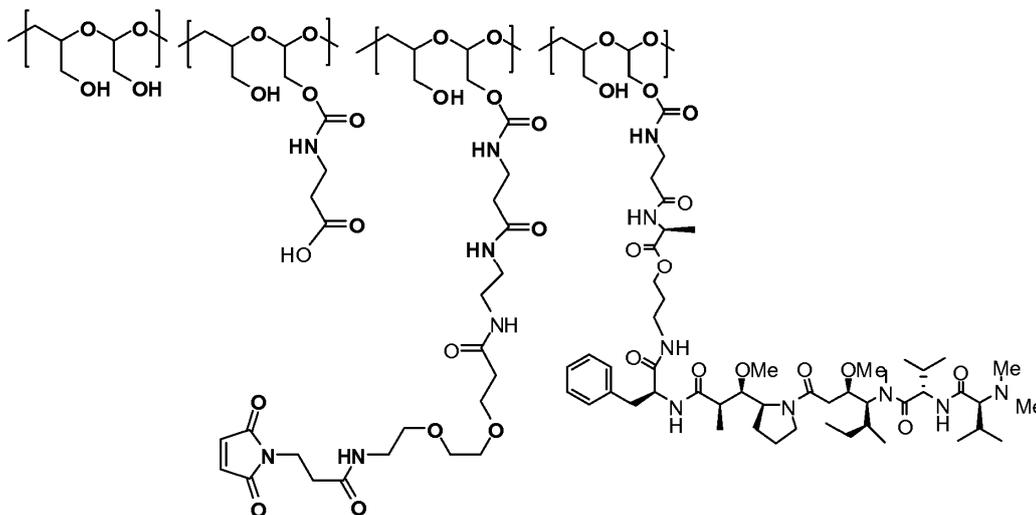
Ejemplo 2. Síntesis de 10K PHF-BA (30%)-EG2-MI (3%)



20 A una solución de 10K PHF-BA (30%) (588 mg, 3.46 mmol, preparada de una manera similar a la descrita en el documento US 13/493,899, ahora Patente U.S. 8,685,383, Ejemplo 1) en agua (10 ml) una solución de EG2-maleimida (102 mg, 0.211 mmol, preparada de manera similar a la descrita en el Ejemplo 1) en agua (5 ml) seguida de la adición de N-hidroxi-succinimida (NHS, 25 mg, 0.211 mmol). La mezcla resultante se enfrió hasta 5-10 °C y el pH se ajustó a 5.8 (desde 5.3) utilizando una solución de NaOH 0.1N. Luego se añadió EDC.HCl (94 mg, 0.486 mmol) en agua (2 ml) a la mezcla de reacción durante 40 minutos. La mezcla de reacción se llevó hasta temperatura ambiente y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 18 horas. El producto resultante se purificó mediante diafiltración en una membrana de 3K MWCO y se liofilizó para dar el compuesto del título como un producto sólido blanquecino (0.460 g, rendimiento del 71%).

30 1H -RMN (400 MHz, D_2O): 6.9 ppm (singlete amplio, MI), 5.0-4.7 ppm (m, 1H, O-CH-O-, acetal- polímero de protones), 4.3-3.6 ppm (m, O-CH₂- esqueleto de polímero y protones enlazadores), 3.4-3.3 ppm (m, CH₂-NH-, beta-alanina y protones enlazadores), 2.7-2.4 ppm (m, CH₂-COOH-, beta-alanina y protones enlazadores). La carga del enlazador EG2-MI (es decir, el contenido de unidades de polímeros que contienen el enlazador EG2-MI) determinada por 1H -RMN era de 3% moles de las unidades estructurales de polímero.

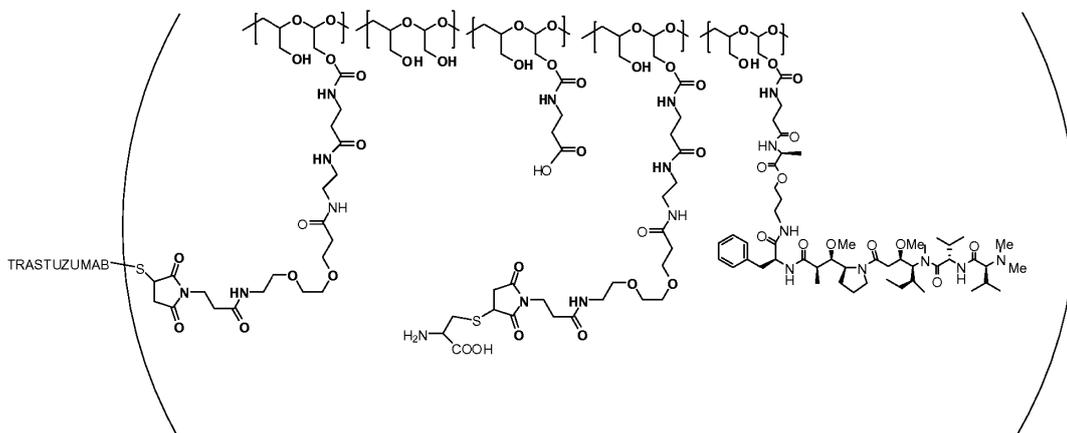
Ejemplo 3. Síntesis de 10K PHF-BA (30%)-EG2-MI (3%)-AF-HPA-Ala (8%)



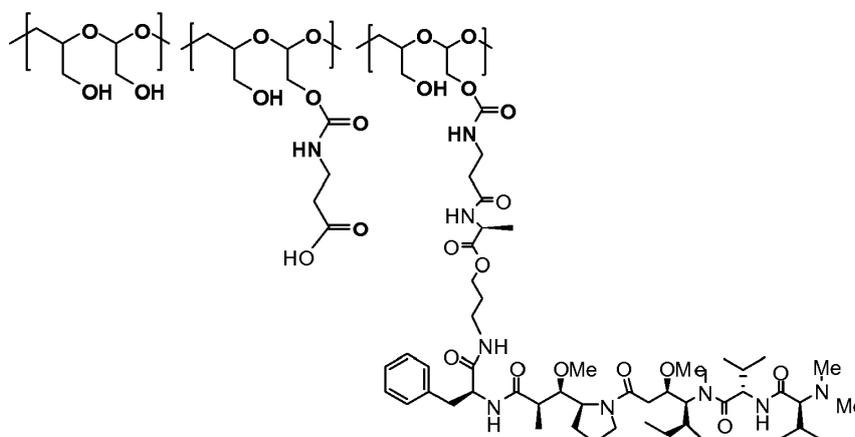
- 5 Una solución homogénea de 10K PHF-BA (30%) EG2-MI (3%) (144 mg, 11.08 μmol , preparada de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2) en agua (4.2 g) se enfrió hasta 5- 10 °C. El pH de la solución se ajustó a 5.8 con HCl 1 N, seguido de la adición de Auristatina F-hidroxiopropilamida-L-alanina.2TFA (AF-HPA-Ala.2TFA) (85 mg, 77.52 μmol , preparado de una manera similar a la que se describe en el documento US 13/493,899, ahora Patente U.S. 8,685,383, Ejemplo 50) disuelto en NMP (1.4 ml) y NHS (16 mg en 0.5 ml de agua). La mezcla se agitó vigorosamente a 5-10°C
- 10 y el pH de la solución se ajustó a 5.8 con NaOH 0.1N. A la mezcla resultante se le añadió una solución acuosa recién preparada de EDC.HCl (30 mg en 0.5 ml de agua). Después de 45 minutos, se añadió EDC.HCl adicional (30 mg en 0.5 ml de agua) y la mezcla resultante se agitó durante 18-24 horas mientras se mantenía el pH a 5.8. El análisis por RP-HPLC de la mezcla de reacción indicó un consumo de > 95% del compuesto de auristatina del material de partida. El producto se purificó por diafiltración en una membrana de 3K MWCO, seguido de purificación por HPLC y liofilización para dar el compuesto del título (143 mg, 78% de rendimiento).
- 15 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O): 7.15 ppm (singlete amplio, protones aromáticos de AF-HPA), 6.9 ppm (singlete amplio, MI), 5.0-4.8 ppm (m, 1H, O-CH-O-acetal- polímero de protones), 4.4-3.6 ppm (m, O-CH₂-esqueleto de polímero y protones de fármaco/enlazador), 3.4-2.8 ppm (m, CH₂-NH-, beta-alanina y protones de fármaco/enlazador), 2.2-1.8 ppm (m, CH₂-COOH-, beta-alanina y protones de fármaco/enlazador) y 1.6-0.9 ppm (m, protones de fármaco/enlazador).

- 20 La carga de fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades de polímero que contiene el fármaco) determinada por $^1\text{H-RMN}$ fue del 8% en moles de las unidades estructurales del polímero (o en promedio de aproximadamente 6 moléculas de AF-HPA por cadena de polímero). El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 17 kDa.

Ejemplo 4. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (3%))-10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))



- 5 A una solución de trastuzumab (6.19 ml, 100 mg, 0.676 μ mol) en regulador de TEAA se añadió una solución de TCEP (0.6 ml, 2.36 μ mol, 0.678 mg) mientras se agitaba. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C, luego se enfrió hasta ~ 0 °C. El trastuzumab parcialmente reducido se agregó luego a una solución vigorosamente agitada de PHF-BA 10K (30%)- EG2-MI (3%)- AF-HPA-Ala (8%) (76 mg, preparada de una manera similar a como se describe en el Ejemplo 3) en regulador TEAA, pH 7.4 (26.5 mL) a 0 °C. La agitación se continuó durante 30 min a 0°C. La reacción se detuvo con una solución acuosa de clorhidrato de cisteína (65 mg, 371 μ mol, 1.9 ml). Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente a pH 7.0, la mezcla de reacción se acidificó a pH 5.0. El producto crudo se purificó por cromatografía seguido de purificación por SEQ para dar el compuesto del título (61 mg, 61% de rendimiento).
- 10 La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 17:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 180 kDa, PDI 1.15. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1.
- 15 El conjugado de PBRM-polímero-fármaco, trastuzumab -((PEG2-MI (3%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%)) (2.5 μ g, preparado de una manera similar a lo descrito anteriormente) se sometió a SDS-PAGE, es decir, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, bajo condiciones no reductoras y reductoras, y se visualizó con Odyssey IRDye® Blue Protein Stain Buffer. Bajo condiciones no reductoras, el conjugado se calentó a 70 °C durante 10 minutos, o no se calentó antes del análisis por SDS-PAGE.
- Los geles de SGS-PAGE mostraron que el conjugado era estable y no se disociaba bajo condiciones no reductoras, tales como 70°C durante 10 minutos. Bajo condiciones reductoras, el conjugado se disocia en fragmentos de cadenas pesadas y ligeras.
- 20 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tal como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.
- 25 Ejemplo 5. Síntesis de 10K PHF-BA (30%)-AF-HPA-Ala (9%)

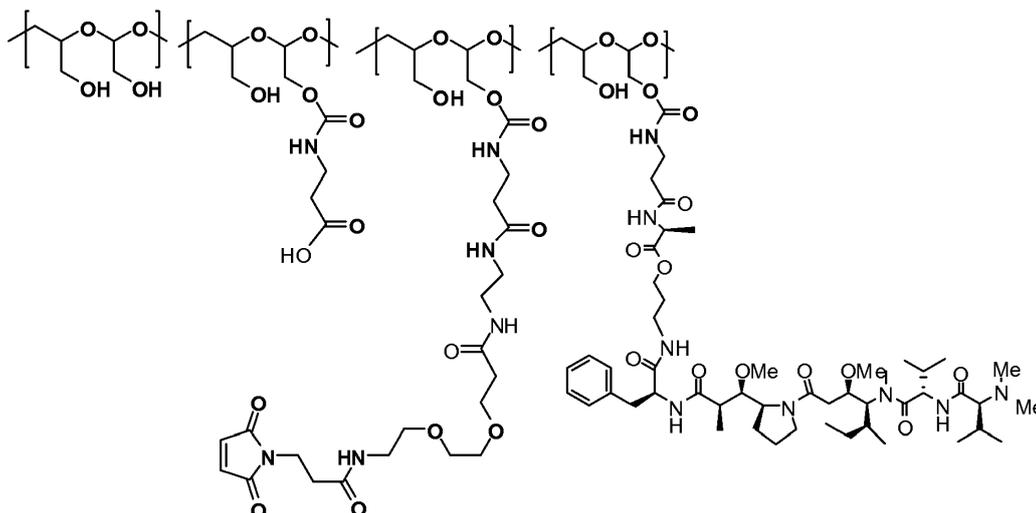


- 30 A una solución homogénea de 10K PHF-BA (30%) (700 mg, preparada de una manera similar a la descrita en el documento US 13/493,899, ahora Patente U.S. 8,685,383, Ejemplo 1) en agua (20 ml) se añadió auristatina F-hidroxiopropilamida-L-alanina.2TFA (AF-HPA-Ala.2TFA) (460 mg, 417 μ mol, preparado de una manera similar a la descrita en el documento US 13/493,899, ahora patente U.S. 8,685,383, Ejemplo 50) disuelto en NMP (6.7 g). La mezcla resultante se agitó vigorosamente mientras se enfriaba hasta 5-10°C. El pH de la solución se ajustó a 5.8, seguido de la adición de NHS (129 mg en 1 ml de agua). A la mezcla resultante se le añadió una solución acuosa recién preparada de EDC.HCl (223 mg en 1 ml de agua). Después de 30 minutos, se añadió EDC.HCl adicional (220
- 35 mg en 1 ml de agua) y la mezcla resultante se agitó durante 18 horas mientras se mantenía el pH a 5.8. El análisis RP-HPLC indicó un consumo de > 95% del compuesto de auristatina del material de partida. El producto se purificó por HPLC y liofilización para dar el compuesto del título (859 mg, 83% de rendimiento).

- 40 ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 7.7 - 7.2 ppm (protones aromáticos singlete ancho, AF-HPA), 5.0-4.8 ppm (m, 1H, polímero O-CH-O-acetal-protón, parcialmente enterrado bajo la señal del agua), 4,4-3,6 ppm (m, esqueleto del polímero O-CH₂- y protones de fármaco/enlazador), 3,5-2,8 ppm (m, CH₂-NH-, beta-alanina y protones de fármaco/enlazador), 2,2-1,6 ppm (m, CH₂-COOH-, beta-alanina y protones de fármaco/enlazador) y 1,6-0,8 ppm (m, protones de fármaco/enlazador).

La carga de fármaco del producto conjugado determinada por $^1\text{H-RMN}$ fue del 8.7% en moles de las unidades estructurales del polímero (o en promedio de aproximadamente 6 moléculas de AF-HPA por cadena de polímero). Conjugado A: se preparó PHF-BA 10K (30%)- AF-HPA-Ala (9.5%) a partir de PHF-BA 10K (30%) (100 mg) utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

5 Ejemplo 6. Síntesis de 10K PHF-BA (30%)-EG2-MI (2%)-AF-HPA-Ala (9%)

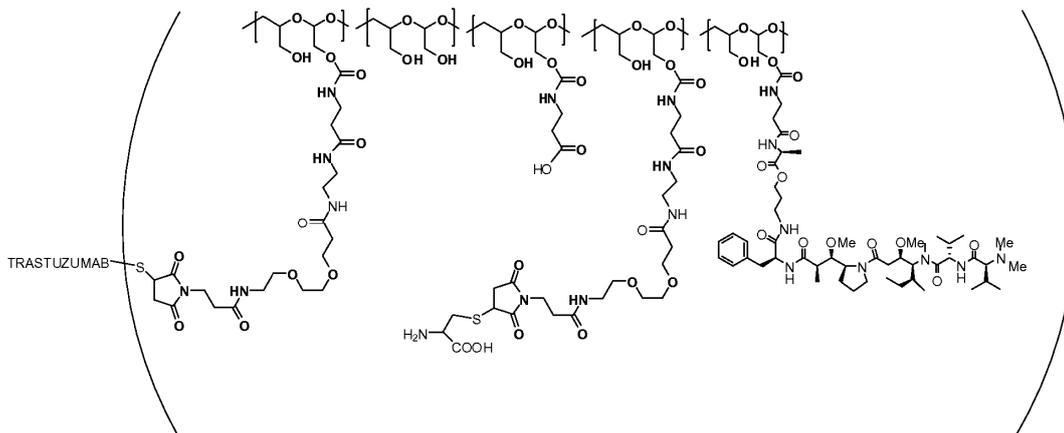


10 A una solución de 10K PHF-BA (30%)-AF-HPA-Ala (9%) (500 mg, 35 μmol , preparada de forma similar a la descrita en el Ejemplo 5) en agua (13.7 ml) se agregó una solución de EG2-maleimida (83 mg, 0.139 mmol, preparada de manera similar a la descrita en el Ejemplo 1) siguió a la N-hidroxi-succinimida (NHS, 40 mg, 0.348 mmol). La mezcla resultante se enfrió hasta 5-10 $^{\circ}\text{C}$ y el pH se ajustó a 5.8 (desde 4.6) utilizando una solución de NaOH 0.1N. Luego se añadió EDC.HCl (174 mg, 0.91 mmol) en agua (2 ml) a la mezcla de reacción durante 40 minutos en dos porciones iguales. El análisis por RP-HPLC de la mezcla de reacción indicó un consumo de $> 95\%$ de la EG2-maleimida. La mezcla de reacción se llevó hasta temperatura ambiente y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 18

15 horas. El producto resultante se purificó por diafiltración en una membrana de 3K MWCO y se liofilizó para dar el compuesto del título como un producto sólido blanquecino (0.57 g, rendimiento del 100%).

20 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O): 7.4 - 7.2 ppm (singlete amplio, protones aromáticos de AF-HPA), 6.9 ppm (singlete amplio, MI), 5.0-4.8 ppm (m, 1H, O-CH-O-acetal- polímero de protones, parcialmente enterrado bajo el pico del agua), 4.4-3.6 ppm (m, O-CH₂- esqueleto de polímero y protones de fármaco/enlazador), 3.5-2.8 ppm (m, CH₂-NH-, beta-alanina y protones de fármaco/enlazador), 2.2-1.6 ppm (m, CH₂-COOH-, beta-alanina y protones de fármaco/enlazador) y 1.6-0.8 ppm (m, protones de fármaco/enlazador). La carga del enlazador EG2-MI determinada por $^1\text{H-RMN}$ fue $\sim 2\%$ mol de las unidades estructurales de polímero. El peso molecular del compuesto del título fue aproximadamente. 20 kDa. En promedio, había 6 moléculas de AF-HPA por cadena de polímero.

25 Ejemplo 7. Síntesis de Trastuzumab-(EG2-MI (2%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9%))

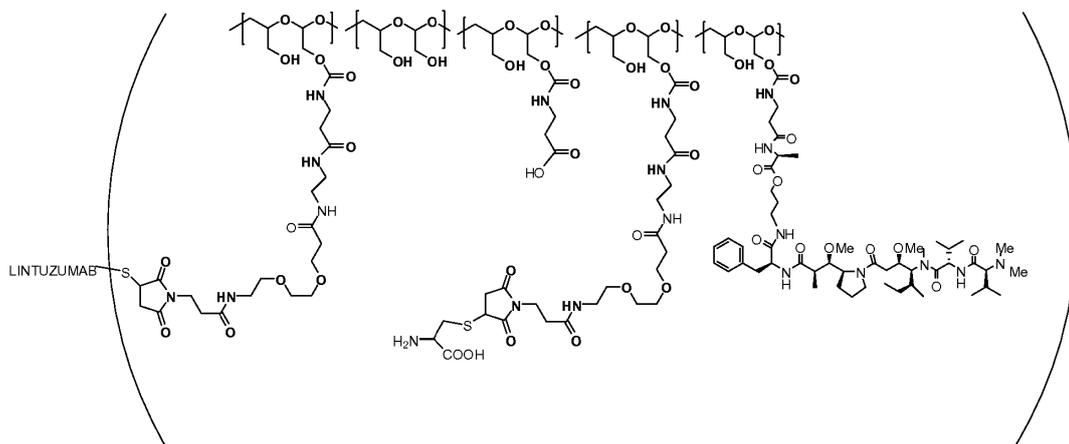


5 A una solución de trastuzumab (6.4 ml, 100 mg, 0.68 μ mol) en regulador de TEAA se le añadió una solución de TCEP (0.993 mg, 3.4 μ mol) mientras se agitaba. La mezcla se incubó durante 1.5 h a temperatura ambiente. El trastuzumab parcialmente reducido se añadió luego a una solución vigorosamente agitada de PHF-BA 10K (30%)-EG2-MI (2%)-AF-HPA-Ala (9%) (86 mg, 4.7 μ mol, preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 6) en regulador de TEAA, pH 7.4 (26.5 ml) a 0 °C. La agitación se continuó durante 45 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con una solución acuosa de cisteína en regulador de TEAA, pH 6.8 (65 mg, 371 μ mol, 1.9 ml). Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente a pH 7.0, la mezcla de reacción se acidificó a pH 5.8. El producto crudo se purificó por purificación SEQ para dar el compuesto del título (35 mg, 35% de rendimiento).

10 La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 21:1. El peso molecular del conjugado del título fue 210 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1.

15 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 8. Síntesis de Lintuzumab-((EG2-MI (2%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9%))

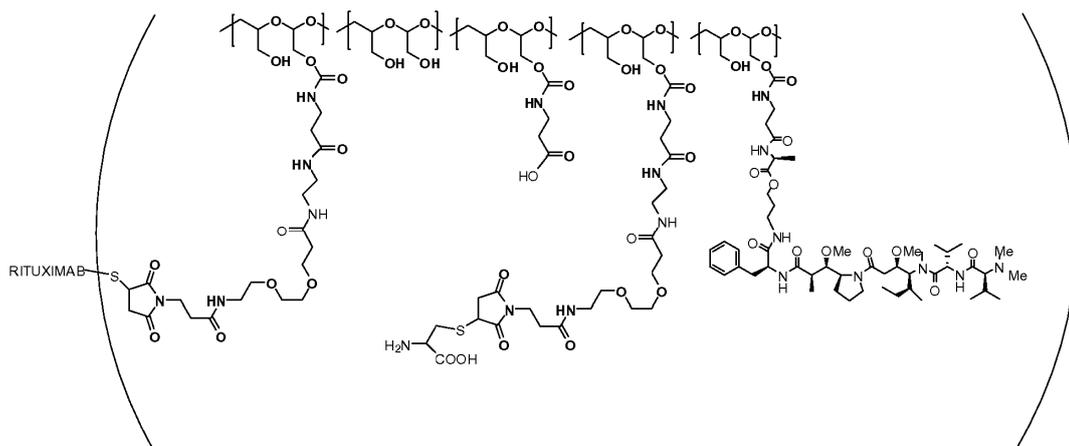


20 El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (30%)-EG2-MI (2%)-AF-HPA-Ala (9%) (preparado de una manera similar a como se describe en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), se usaron lintuzumab y TCEP: lintuzumab 3.5:1.

25 La relación AF-HPA a lintuzumab fue de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 184 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a lintuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1.

30 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 9. Síntesis de Rituximab-((EG2-MI (3%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))

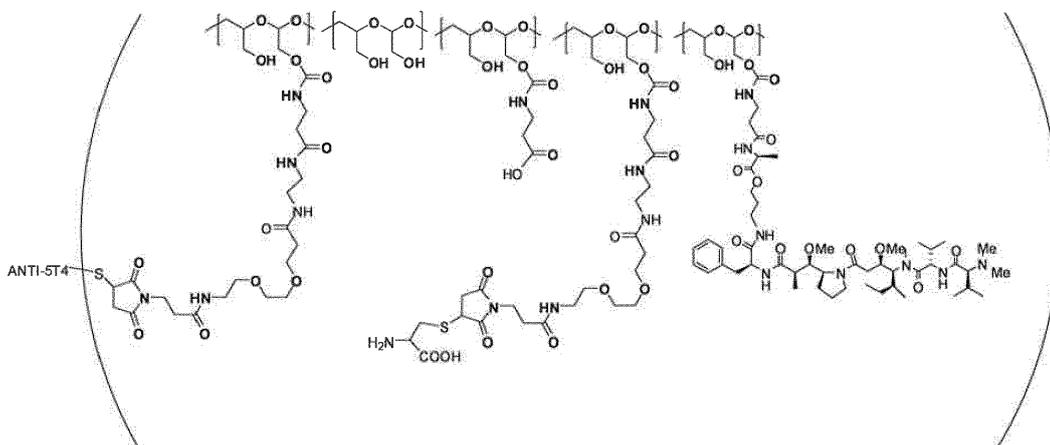


El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (30%)- EG2-MI (3%)- AF-HPA-Ala (8%) (preparado de una manera similar a como se describe en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), se utilizaron rituximab y TCEP: rituximab 3.5:1.

- 5 La relación AF-HPA a rituximab fue de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 18:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 163 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a rituximab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1.

- 10 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 10. Síntesis de Anti-5T4-((EG2-MI (3%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))



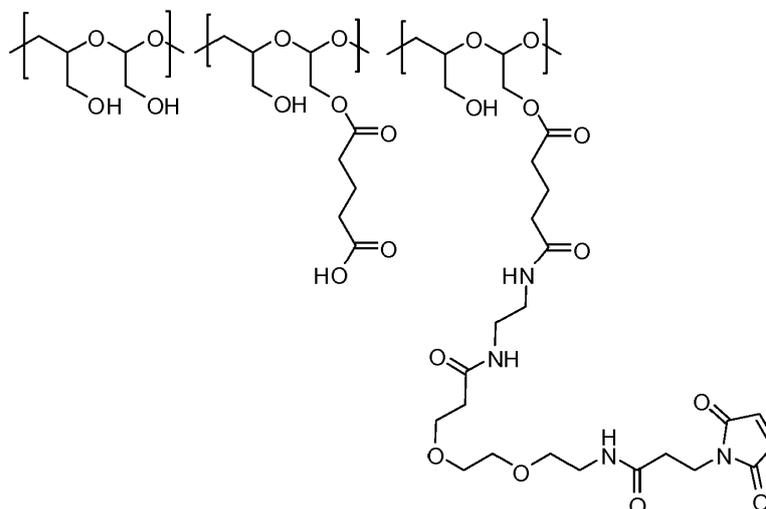
- 15 El compuesto del título ("conjugado de fármaco polímero anti-5T4 scFvFc", o "scADC anti-5T4") se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (30%)- EG2-MI (3 %)-AF-HPA-Ala (8%) (preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), y se utilizaron anticuerpos scFvFc anti-5T4 y TCEP: anticuerpo scFvFc anti-5T4 3:1. El anticuerpo scFvFc anti-5T4 (proteína de fusión anticuerpo-Fc de cadena simple anti-5T4) se preparó de forma recombinante en células CHO DG44, como se describe en la Solicitud Provisional U.S. Número 61/835,858, presentada el 17 de junio de 2013.

20 La relación AF-HPA a anticuerpo anti-5T4 fue de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 200 kDa. La relación promedio de conjugado de fármaco-PHF a anticuerpo anti-5T4 fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1 o aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1.

- 25 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos

anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 11. Síntesis de 10K PHF-GA (29%)-EG2-MI (1%)



5

10

A una solución de 10K PHF-GA (29%) (1.7 g, 10.1 mmol, preparada de una manera similar a la descrita en el documento US 13/493,899, ahora Patente U.S. 8,685,383, Ejemplo 2) en agua (35 ml) una solución de EG2-maleimida (204 mg, 0.42 mmol, preparada de manera similar a la descrita en el Ejemplo 1) en DMA (3 ml) seguida de la adición de N-hidroxi-succinimida (NHS, 70.3 mg, 0.611 mmol). La mezcla resultante se enfrió hasta 5-10°C. Luego se añadió EDC.HCl (269 mg, 1.402 mmol) en agua (2 ml) a la mezcla de reacción en dos porciones iguales durante 40 minutos. La mezcla de reacción se llevó hasta temperatura ambiente y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 18 horas. El producto resultante se purificó por diafiltración en una membrana de 3K MWCO y se liofilizó para dar el compuesto del título como un producto sólido blanquecino (1.7 g, rendimiento del 91%).

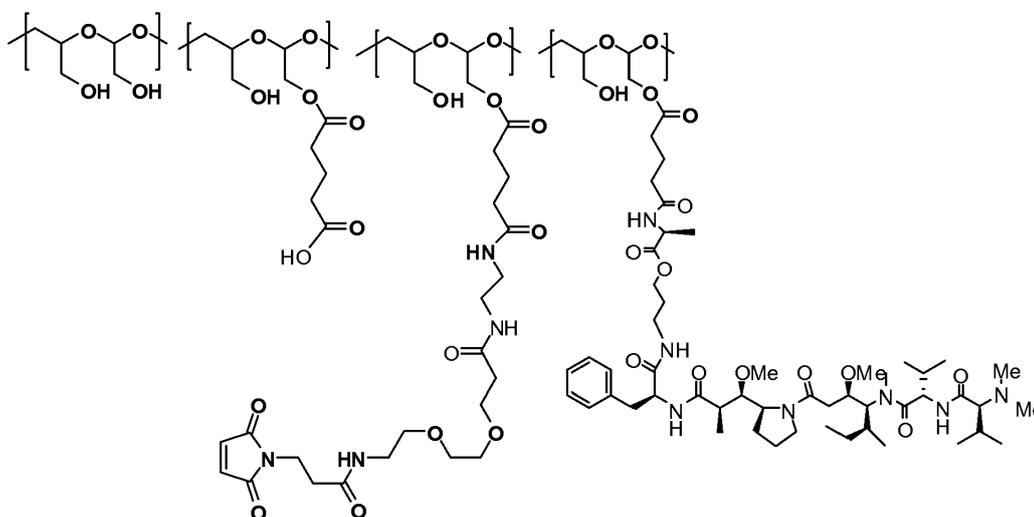
15

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O): 6.9 ppm (singlete amplio, MI), 5.0-4.7 ppm (m, 1H, O-CH-O-, acetal- polímero de protones, parcialmente enterrado bajo el pico del agua), 4.4-3.6 ppm (m, O-CH₂-esqueleto de polímero y protones enlazadores), 3.3-2.6 ppm (m, protones enlazadores), 2.5 ppm (m, CH₂-CO-, protones glutáricos), 2.3 ppm (singlete amplio, CH₂-COO-, protones glutáricos), 1.9 ppm (singlete amplio, -CH₂-CH₂- CH₂-CO-, protones glutáricos).

La carga del enlazador EG2-MI determinada por $^1\text{H-RMN}$ fue 1% en moles de las unidades estructurales del polímero.

20

Ejemplo 12. Síntesis de 10K PHF-GA (29%)-EG2-MI (1%)-AF-HPA-Ala (6%)



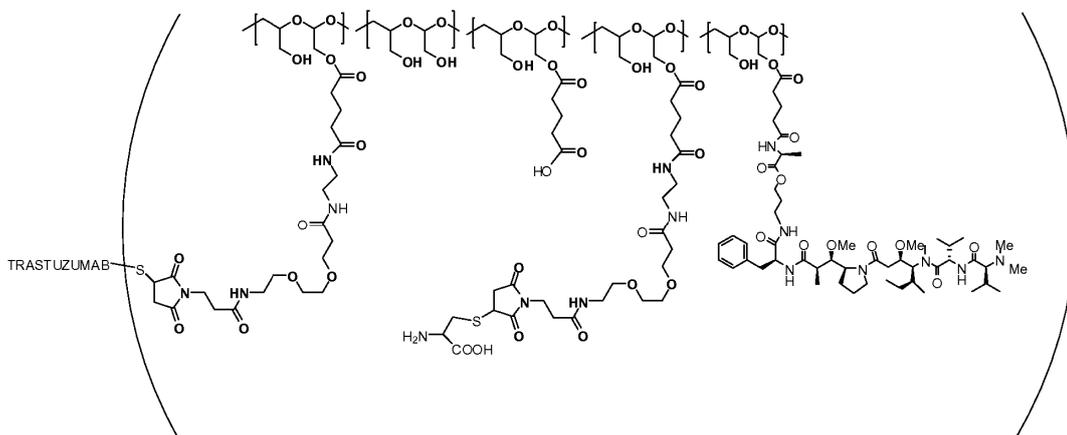
Se añadió una solución homogénea de 10K PHF-GA (29%)- EG2-MI (1%) (214 mg, 15 μmol , preparada de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 11) en agua (5,4 g). HPA-Ala.2TFA) (98 mg, 90 μmol , preparado de una manera

similar a la descrita en el documento US 13/493,899, ahora Patente U.S. 8,685,383, Ejemplo 50) disuelto en NMP (1,85 ml) y NHS (25 mg en 0,5 ml de agua). La mezcla se agitó vigorosamente a 5-10°C. A la mezcla resultante se le añadió una solución acuosa recién preparada de EDC.HCl (40 mg en 0,8 ml de agua). Después de 30 minutos, se añadió EDC.HCl adicional (44 mg en 0,8 ml de agua) y la mezcla resultante se agitó durante 18-24 horas mientras se mantenía el pH a 5.8. El análisis RP-HPLC indicó el consumo > 95% del compuesto de auristatina del material de partida. El producto se purificó por diafiltración en membrana 3K MWCO y se concentró a 10 ml para dar el compuesto del título (177 mg, 63% de rendimiento).

¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 7.4 - 7.2 ppm (singlete amplio, protones aromáticos de AF-HPA), 6.9 ppm (singlete amplio, MI), 5.0-4.8 ppm (m, 1H, O-CH-O-, acetal- polímero de protones), 4.4-3.6 ppm (m, O-CH₂- esqueleto de polímero y protones enlazadores), 3.4-2.9 ppm (m, drug protones enlazadores), 2.5 ppm (triplete amplio, CO- CH₂-, protones glutáricos), 2.4-2.2 ppm (m, CH₂-COO-, protones glutáricos y protones de fármaco/enlazador), 2.0 - 1.8 ppm (m, -CH₂-CH₂- CH₂-CO-, protones glutáricos), 1.5- 0.8 (m, protones de fármaco/enlazador).

La carga de fármaco del producto conjugado determinada por ¹H-RMN fue del 5.9% en moles de las unidades estructurales del polímero (o en promedio de aproximadamente 4.5 moléculas de AF-HPA por cadena de polímero). El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 17 kDa.

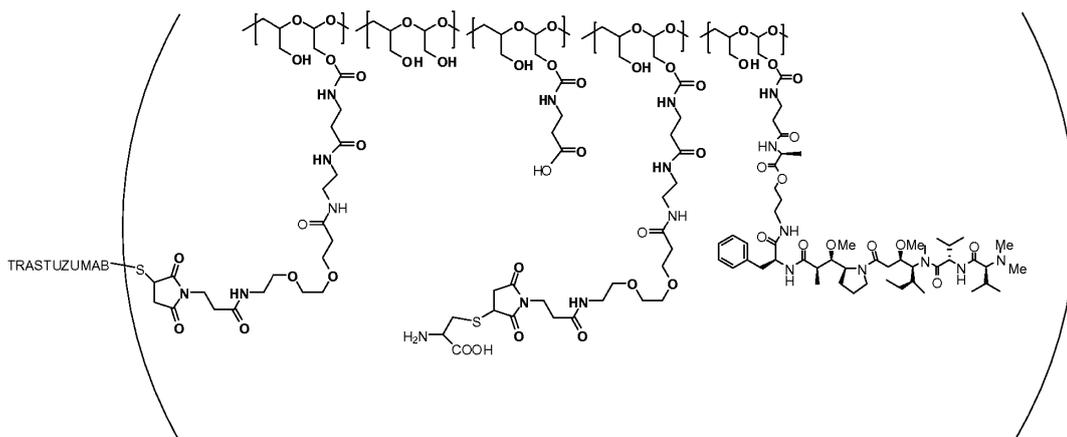
Ejemplo 13. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (1%))-(10 kDa PHF-GA (29%)-(AF-HPA-Ala (6%)))



El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-GA (29%) - EG2-MI (1%) - AF-HPA-Ala (6%) (78 mg, preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 12) y se usaron trastuzumab (25 mg) y TCEP: trastuzumab 3.5:1. La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 23:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 200 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 5:1.

Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 14. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%)))

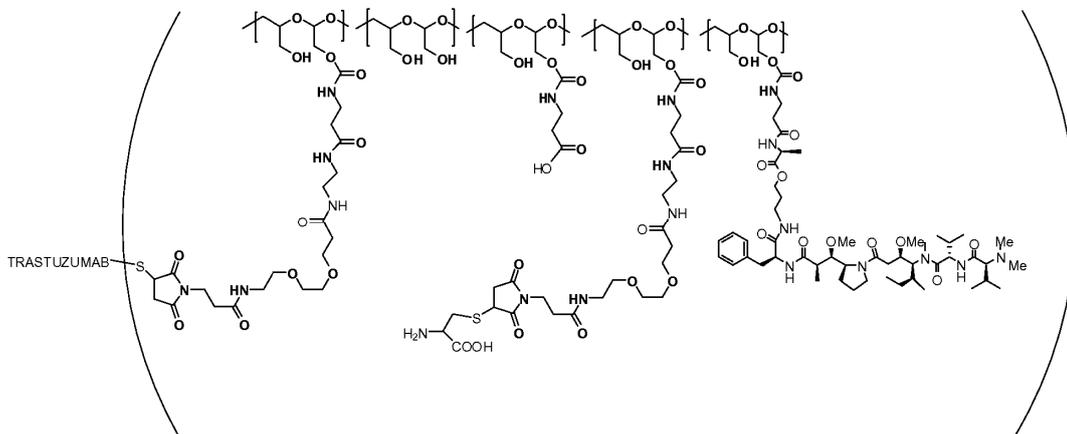


El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (28%)- EG2-MI (2%)- AF-HPA-Ala (9%) (11 mg, preparado usando el procedimiento descritos en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6, se utilizaron trastuzumab (620 mg) y TCEP: trastuzumab 3.5:1.

- 5 La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 183 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

- 10 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gentuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 15. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))

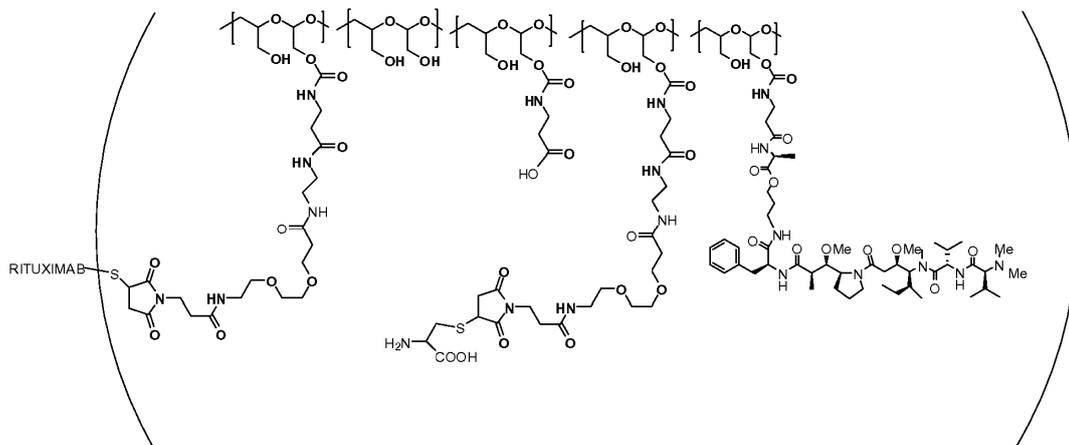


- 15 El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (28%)- EG2-MI (2%)- AF-HPA-Ala (9%) (243 mg, preparado usando el procedimiento descritos en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), se utilizaron trastuzumab (435 mg) y TCEP: trastuzumab 3:1.

- 20 La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 16:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 197 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

- 25 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gentuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 16. Síntesis de Rituximab-((EG2-MI (2%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))



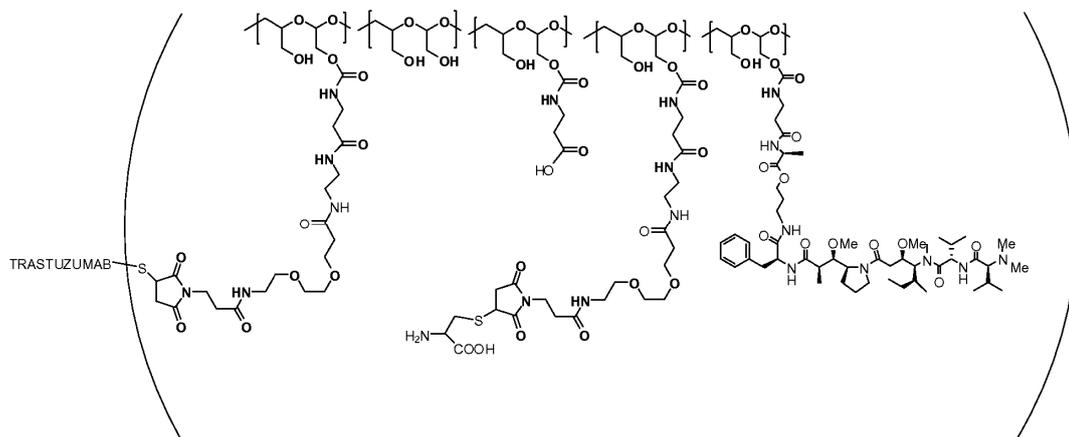
5 El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (28%)- EG2-MI (2%)- AF-HPA-Ala (9%) (170 mg, preparado usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6) se usaron 300 mg de rituximab y TCEP: rituximab 3:1.

La relación AF-HPA a rituximab fue de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 18:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 180 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a rituximab fue de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1.

10 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tal como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 17. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))

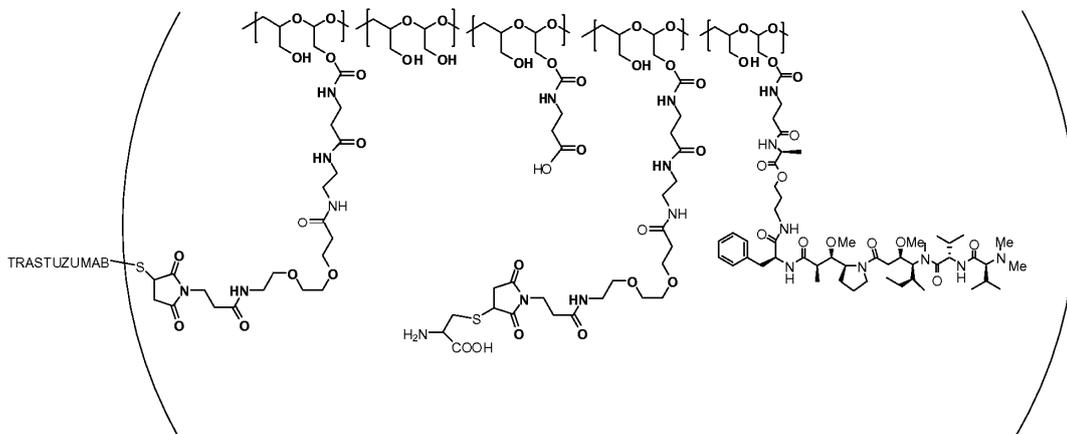
15



20 El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (28%)- EG2-MI (2%)- AF-HPA-Ala (9%) (8.4 mg, preparado usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 o en el Ejemplo 6, se usaron trastuzumab (15 mg) y (TCEP: trastuzumab 3.5:1. La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1. El peso molecular del conjugado del título fue 183 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco y trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

25 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 18. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))



El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7.

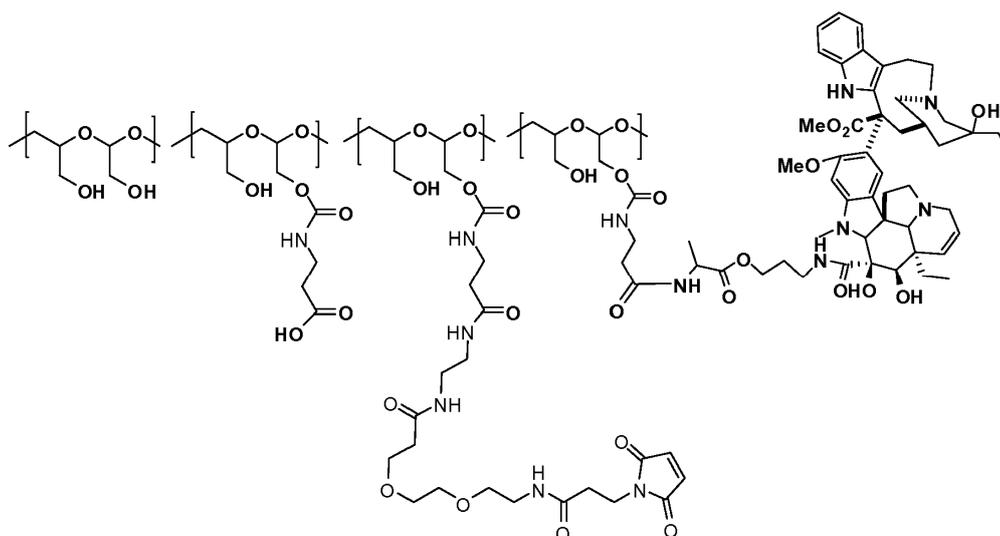
5 Conjugado A- La relación de AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 19:1 a aproximadamente 24:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 201 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

Conjugado B: la relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 25:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 224 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

10 Conjugado C: la relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 23:1 a aproximadamente 28:1. El peso molecular del conjugado del título fue de 259 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

15 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 19 Síntesis de 10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%)-(HPV-Ala (14%)



20 Una solución homogénea de 10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2.7%) (25.00 mg, 2.80 μ mol, preparada de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2) en agua (0.612 ml y NMP (0.14 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadió 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (8.06 mg, 0.07 mmol) en NMP (0,14 ml) seguido de HPV-alanina (15.56 mg, 0.018 mmol, preparada de manera similar a la que se describe en la Patente U.S. N° 8,524,214, Ejemplo 1) en agua (0.250 ml) La

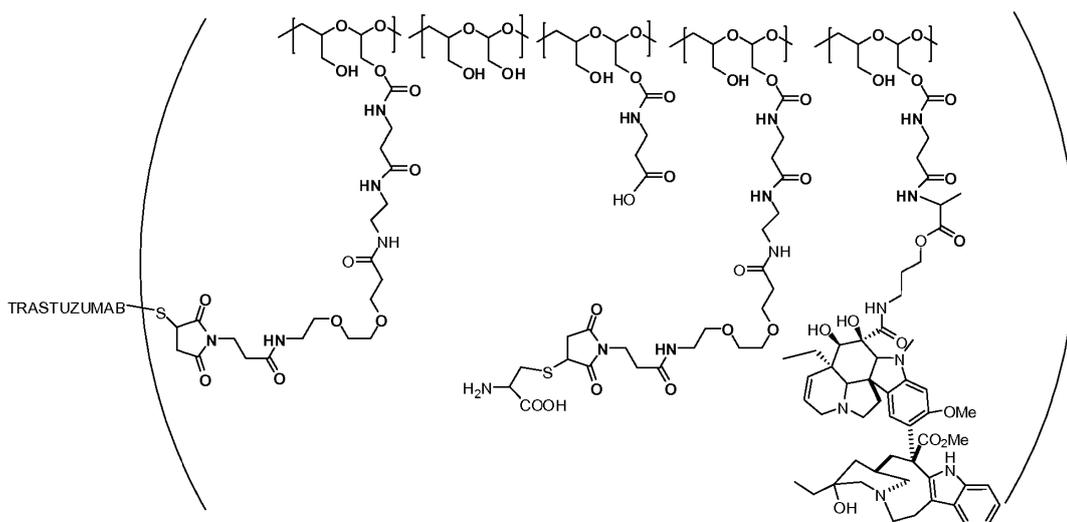
mezcla se agitó vigorosamente hasta que todos los materiales se disolvieron y luego se añadió una solución acuosa recién preparada de EDC.HCl (6.71 mg en 0.125 ml de agua). Después de 45 minutos, se añadió EDC.HCl adicional (6.71 mg en 0.125 ml de agua) y la mezcla resultante se agitó durante 18 horas mientras se mantenía el pH a 5.8. El análisis por RP-HPLC de la mezcla de reacción indicó que la reacción estaba incompleta. se enfrió hasta 0 °C y se agregó EDC.HCl (12 mg en 0.250 mL). El pH de la solución se ajustó a 5.9 con NaOH 0.1 N y la mezcla se agitó durante 2 h adicionales, momento en el que el análisis RP-HPLC de la mezcla de reacción indicó el consumo completo del material de partida. El producto se purificó por cromatografía de columna (Sephadex G25 Gel) seguido de purificación por HPLC y liofilización para obtener el compuesto del título (10.18 mg), Rendimiento del 24%).

Conjugado A: se preparó PHF-BA 10K (30%) EG2-MI (2,7%)-(HPV-Ala (14%) de una manera similar a la descrita anteriormente. La carga de fármaco del producto conjugado (es decir, contenido de unidades de polímero que contienen el fármaco) determinado por ¹H-RMN fue 14% en moles de las unidades estructurales de polímero (es decir, en promedio 2.4 moléculas de HPV-Ala por cadena de polímero).

Conjugado B: se preparó PHF-BA 10K (30%) EG2-MI (2,7%)-(HPV-Ala (7,7%) utilizando el procedimiento descrito anteriormente. La carga del fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades de polímeros que contienen el fármaco determinado por ¹H-RMN fue 28.3% en moles de las unidades estructurales del polímero (es decir, en promedio 4.6 HPV-Ala moléculas por cadena de polímero).

Conjugado C: se preparó PHF-BA 10K (30%) EG2-MI (3.5%)-(HPV-Ala (4,3%) usando el procedimiento descrito anteriormente. La carga del fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades de polímeros que contienen el fármaco) determinado por HPLC fue del 4.3% en moles de las unidades estructurales del polímero (es decir, en promedio de 2.6 moléculas de HPV-Ala por cadena de polímero).

Ejemplo 20 Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(HPV-Ala (14%))



El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto 10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2,7%)-(HPV-Ala (14%) (1,5 mg, preparado de una manera similar a como se describe en el Ejemplo 19), se usaron trastuzumab y TCEP: trastuzumab 4:1.

Conjugado A: Trastuzumab -((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(HPV-Ala (14%)). La proporción de HPV-Ala a trastuzumab fue de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 18:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 168 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco y trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

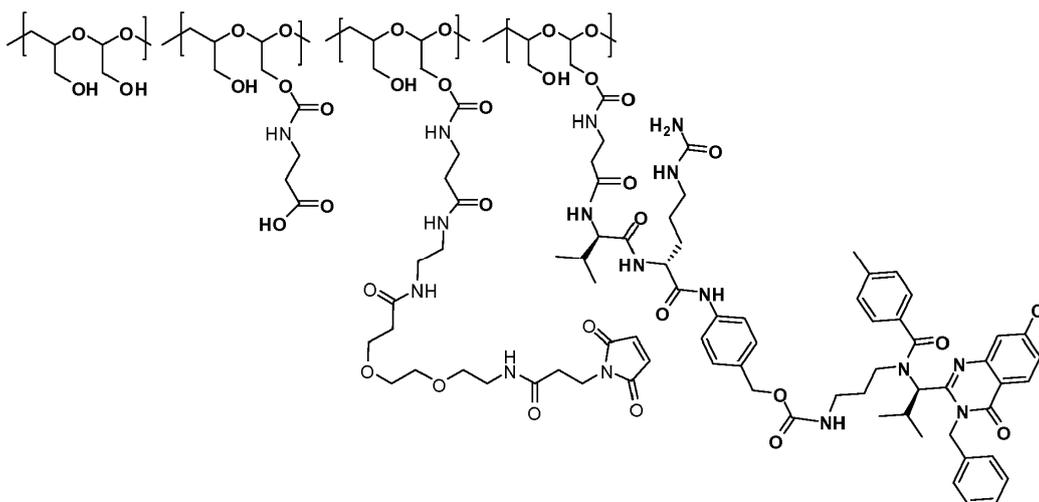
Conjugado B: Trastuzumab -((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(HPV-Ala (7.7%)) se preparó usando el procedimiento anterior excepto 10K PHF-BA (30%) Se usaron EG2-MI (2.7%)-(HPV-Ala (7.7%) (5.7 mg, Ejemplo 19, conjugado B), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 4:1. La relación de HPV-Ala a trastuzumab fue de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 14:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 180 kDa. La proporción promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

Conjugado C: Trastuzumab -((EG2-MI (3.5%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(HPV-Ala (4.3%)) se preparó de una manera similar a la descrita en este ejemplo, excepto 10K PHF-BA (30%) EG2-MI (2,7%)-(HPV-Ala (4.3%) (4.2 mg, preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 19 conjugado C), se usaron trastuzumab y TCEP: trastuzumab 4: 1. La relación HPV-Ala a trastuzumab fue de aproximadamente 8.5:1 a aproximadamente 12:1. El peso molecular del

conjugado del título fue de aproximadamente 181 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4 :1.

Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

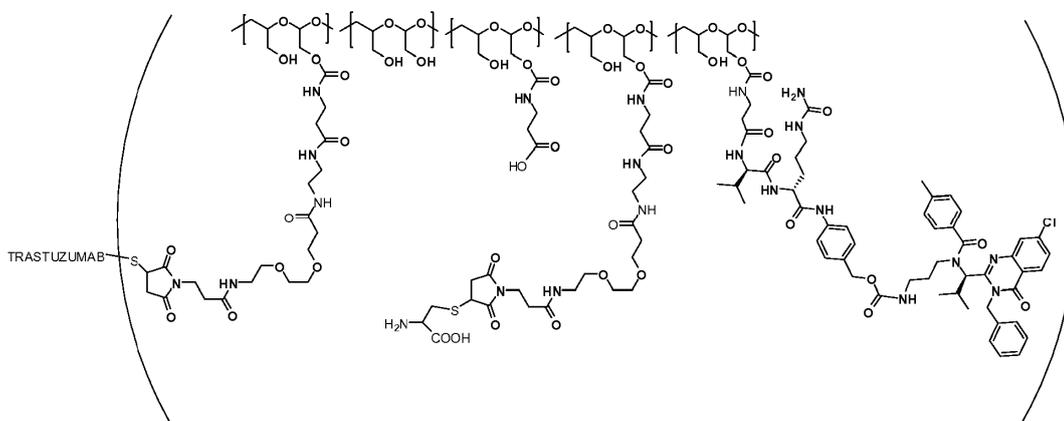
Ejemplo 21 Síntesis de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(Ispinesib-PABA-Val-Cit (3.5%))



A una solución de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2,7%) (60,8 mg, preparada de manera similar a la descrita en el Ejemplo 2) en 5 ml de NMP, se añadió Ispinesib-PABA-Val-Cit- NH₂ (sal de TFA, 10,0 mg, preparada de manera similar a la descrita en la patente U.S. No. 8,815,226, ejemplo 84) en NMP (0,5 ml). A esta mezcla se le añadió HATU (5,5 mg) en NMP (0.5 ml) seguido de DIEA (4,4 mg). La mezcla de reacción se agitó 5-10 min a temperatura ambiente. La mezcla cruda se purificó por ultrafiltración para dar el compuesto del título (Rendimiento: 64%, basado en Ispinesib).

La carga de fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades poliméricas que contienen el fármaco) determinada por UV fue del 3.5% en moles de las unidades estructurales poliméricas (o, en promedio, aproximadamente 2.5 moléculas de ispinesib-PABA-Val-Cit por cadena de polímero).

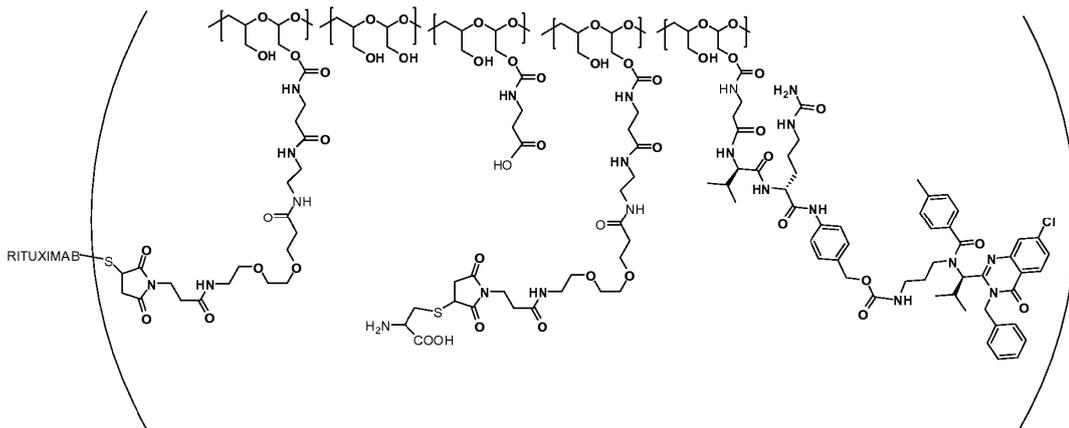
Ejemplo 22. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (28%)-(10 kDa PHF-BA (2.7%)-(Ispinesib-PABA-Val-Cit-(3.5%)))



El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto que se usaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2,7%)-(Ispinesib-PABA-Val-Cit (3,5%)) (5,6 mg, preparado de forma similar a la descrita en el Ejemplo 21), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 3.5:1. La relación de ispinesib a trastuzumab fue de aproximadamente 7.5:1 a aproximadamente 10:1. La relación promedio de conjugado de fármaco-PHF a trastuzumab fue aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

- Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

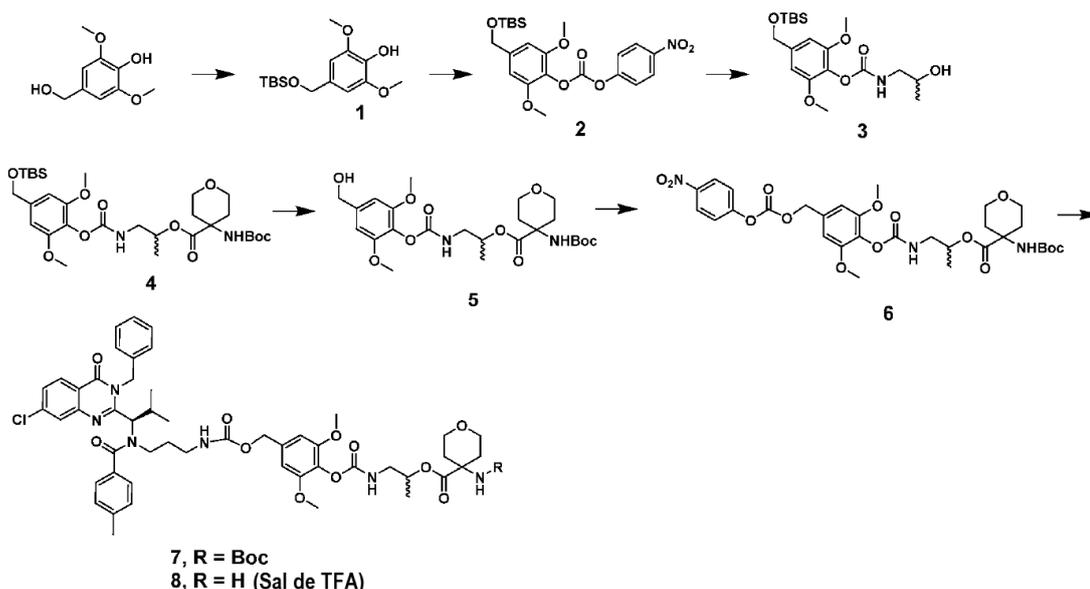
Ejemplo 23. Síntesis de Rituximab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(Ispinesib-PABA-Val-Cit-(3.5%)))



- 10 El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 22, excepto que se utilizaron rituximab y TCEP: rituximab 3.5:1. La relación de ispiresib a rituximab fue de aproximadamente 6.5:1 a aproximadamente 10:1. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

- 15 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

- 20 Ejemplo 24. Síntesis de THP-2-metil-Ispinesib



Compuesto 1: A una solución de 4-(hidroximetil)-2,6-dimetoxifenol (2.77 g) en 25 ml de DMA se le añadió imidazol (1.13 g). La mezcla se enfrió hasta 0°C bajo argón y luego se añadió TBSCI (2.49 g). La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 días bajo una atmósfera de argón protegida de la luz. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (300 ml) y se lavó con NH₄Cl saturado (100 ml) y luego con salmuera (100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica gel (Hex/EtOAc, 0% B -30% B) para dar un aceite incoloro (2.24 g, 50% de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.17 (s, 1H), 6.54 (s, 2 H), 4.59 (s, 2 H), 3.72 (s, 6 H), 0.89 (s, 9 H), 0.05 (s, 6 H).

Compuesto 2: a una solución enfriada con hielo del compuesto 1 (0.508 g), TEA (0.603 g) y DMAP (0.021 g) en 5 ml de THF seco, se agregó una solución de cloroformiato de 4-nitrofenilo (0.68 g) en 3 ml de THF. Se retiró el baño de hielo y se continuó la agitación a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con NH₄Cl (20 ml) y luego se extrajo con acetato de etilo (60 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y luego se concentraron para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica gel (Hex: acetato de etilo, 0% B -20% B) para proporcionar el compuesto 2 como sólido incoloro (0.724 g, 92% de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.32-8.28 (m, 2 H), 7.51-7.48 (m, 2 H), 7.12 (s, 1 H), 6.64 (s, 1 H), 4.75 (d, 2 H, J = 12.9 Hz), 3.93 (d, 3 H, J = 13.5 Hz), 3.88 (s, 3 H), 1.0-0.94 (m, 9 H), 0.15 (s, 3 H), 0.12 (s, 3 H).

Compuesto 3: a una solución del compuesto 2 (0.5 g) en 5 ml de THF seco se le añadió HOBt (0.291 g) y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 5 min. A esta mezcla se le añadió 2-aminopropanol (0.324 g) y TEA (0.546 g). La mezcla resultante se agitó ~1 h a 0 °C, momento en el que la TLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla se diluyó con DCM (60 ml) y se lavó con NH₄Cl saturado (20 ml) seguido de salmuera (20 ml). Los extractos orgánicos se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron para dar un aceite de color amarillo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea en sílica gel (Hex:acetato de etilo, 0% B-80% B) para proporcionar el compuesto 3 en forma de un sólido de color amarillo (0.356 g, rendimiento 83%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.50 (t, 1 H J = 5.8 Hz), 6.64 (s, 2 H), 4.68 (s, 2 H), 4.64 (d, 1 H, J = 4.8 Hz), 3.71 (s, 6 H), 3.70-3.61 (m, 1 H), 3.04-2.96 (m, 1 H), 2.96-2.86 (m, 1 H), 1.05 (d, 3 H, J = 6.1 Hz), 0.10 (s, 6 H); ESI MS: teórico C₁₉H₃₃NO₆Si (M + H) 400.2, encontrado 400.2.

Compuesto 4: a una solución enfriada con hielo del compuesto 3 (0.358 g) y DMAP (0.219 g) en 5 ml de DCM seco, se agregó una solución de DCC (0.369 g) en ~5 ml de DCM bajo argón. El baño de hielo se retiró y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, se diluyó con DCM (~60 mL) y se lavó con NH₄Cl saturado (2 x 20 mL) seguido de salmuera (~20 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica gel para proporcionar el compuesto 4 en forma de un aceite incoloro (0.422 g, 75% de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.65 (s, 1 H), 7.39 (s, 1 H), 6.64 (s, 2 H), 4.93-4.84 (m, 1 H), 4.68 (s, 2 H), 3.71 (s, 6 H), 3.68-3.62 (m, 1 H), 3.62-3.47 (m, 4 H), 3.16 (t, 2 H, J = 5.9 Hz), 2.88 (s, 4 H), 2.01-1.93 (m, 2 H), 1.91-1.77 (m, 3 H), 1.75-1.66 (m, 1 H), 1.57-1.47 (m, 1 H), 1.39 (s, 9 H), 1.35-1.29 (m, 1 H), 1.28-1.22 (m, 1 H), 1.15-1.10 (m, 3 H), 0.92 (s, 9 H); ESI MS: teórico C₃₀H₅₀N₂O₁₀Si (M + H) 627.3, encontrado 527.2 (M - Boc + H).

Compuesto 5: una solución de compuesto 4 (0.400 g) y SnCl₂dihidrato (0.144 g) en EtOH/agua (7.25 mL, 9:1) se agitó a temperatura ambiente aproximadamente 3 h bajo argón. Una vez completada la reacción (TLC), la mezcla de reacción se diluyó con 60 ml de EtOAc y luego se lavó con NH₄Cl saturado (20 ml) y salmuera (20 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica gel (Hex: acetato de etilo, 0% B-100% B) para proporcionar el compuesto 5 en forma de un aceite incoloro (0.220 g, 67 % rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6.61 (s, 2 H), 5.82 (brs, 1 H), 5.16 (brs, 1 H), 4.87 (m, 1 H), 4.64 (s, 2 H), 3.90-3.75 (m, 8 H), 3.75-3.62 (m, 2 H), 3.62-3.51 (m, 1 H), 3.41-3.18 (m, 1 H), 2.31-2.13 (m, 2 H), 1.93-1.81 (m, 2 H), 1.44 (s, 9 H), 1.29 (d, 3 H, J = 6.6 Hz); ESI MS: teórico C₂₄H₃₆N₂O₁₀ (M + H) 513.2, encontrado 413.2 (M - Boc + H).

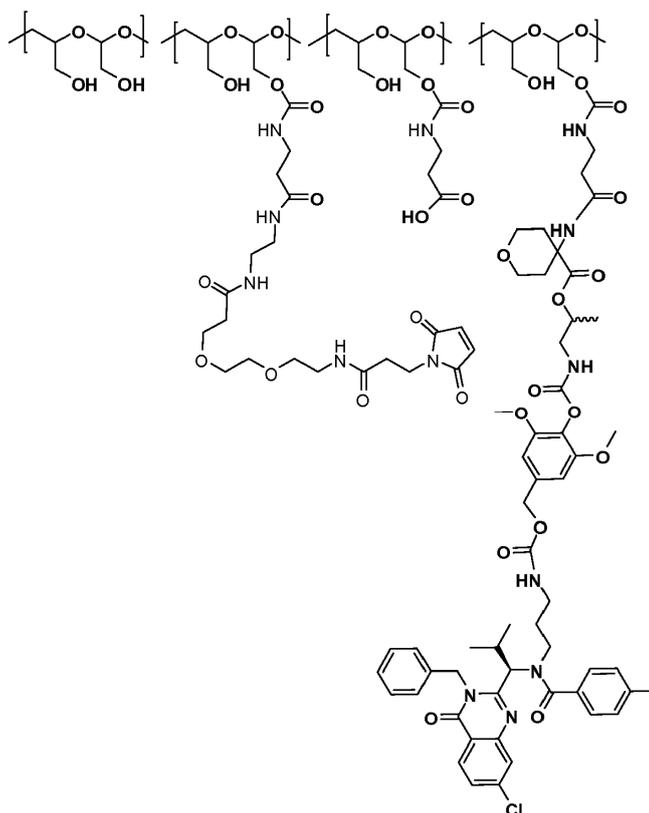
Compuesto 6: A una solución del compuesto 5 (0.220 g) en 2 ml de THF seco se le añadió TEA (0.152 g). La mezcla se enfrió hasta 0°C y se añadió cloroformiato de p-nitrofenilo (0.087 g) como un sólido. La mezcla se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante aproximadamente 4 h. Se añadió cloroformiato adicional (~0.05 g en ~1 mL THF) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con 30 ml de EtOAc y luego se lavó con NH₄Cl saturado (10 ml) seguido de salmuera (10 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para proporcionar el producto crudo en forma de un aceite. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea sobre sílica gel (hexano: EtOAc 0% B a 90% B) para proporcionar el compuesto 6 en forma de un sólido incoloro (0.257 g, rendimiento del 88%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, 2 H, J = 9.3 Hz), 7.39 (d, 2 H, J = 9.8 Hz), 6.67 (s, 2 H), 5.90 (brs, 1 H), 5.23 (s, 2 H), 5.21-5.13 (m, 1 H), 4.87 (brs, 1 H), 3.89-3.76 (m, 8 H), 3.75-3.64 (m, 2 H), 3.63-3.53 (m, 1 H), 2.30-2.19 (m, 1 H), 1.95-1.83 (m, 2 H), 1.44 (s, 9 H), 1.29 (d, 3 H, J = 6.7 Hz); ESI MS: teórico C₃₁H₃₉N₃O₁₄ (M + H) 678.2, encontrado 578.2 (M - Boc + H).

Compuesto 7: a una solución del compuesto 6 (53.5 mg) en 0.5 ml de DMA seco se le añadió Ispinesib (37.1 mg), DIEA (9.27 mg) y HOAt (2.93 mg) en sucesión. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo nitrógeno. La mezcla de reacción cruda se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Hex: acetato de etilo 50% B-90% B durante 25 min, TFA al 0.1% en ambas fases móviles) para proporcionar el compuesto 7 en forma de un sólido incoloro (64 mg, 84% de rendimiento). ESI MS: teórico C₅₅H₆₇ClN₆O₁₃ (M + H) 1055.5, encontrado 1055.4.

Compuesto 8: a una solución enfrida con hielo del compuesto 7 (64 mg) en 2 ml de DCM seco, se le añadió 1 ml de TFA bajo nitrógeno. Se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, momento en el que LC/MS indicó que la reacción se había completado. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria y el residuo se liofilizó para proporcionar el compuesto 8 en forma de un sólido incoloro (64 mg, 99%). ESI MS: teórico $C_{50}H_{59}ClN_6O_{11}$ (M + H) 955.4, encontrado 955.3.

5

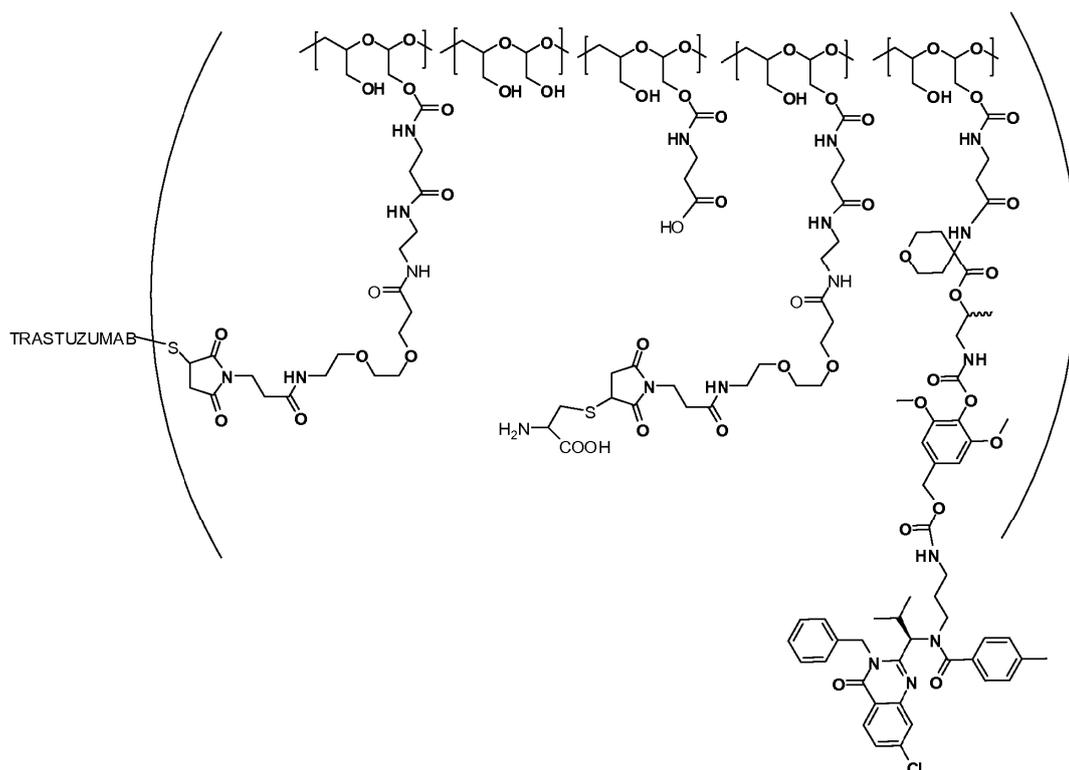
Ejemplo 25 Síntesis de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(THP-2-metil-Ispinesib) (2.4%)



- 10 El compuesto del título se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 21 usando 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) (58.9 mg, preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2) y THP -2-metil-Ispinesib (10,0 mg, preparado de manera similar a la descrita en el Ejemplo 24; 46% de rendimiento (basado en Ispinesib).

La carga de fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades poliméricas que contienen el fármaco) determinada por UV fue del 2.4% en moles de las unidades estructurales poliméricas (o en promedio de aproximadamente 1.7 moléculas de THP-2-metil-Ispinesib por cadena de polímero).

- 15 Ejemplo 26. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(THP-2-metil-Ispinesib) (2.4%))



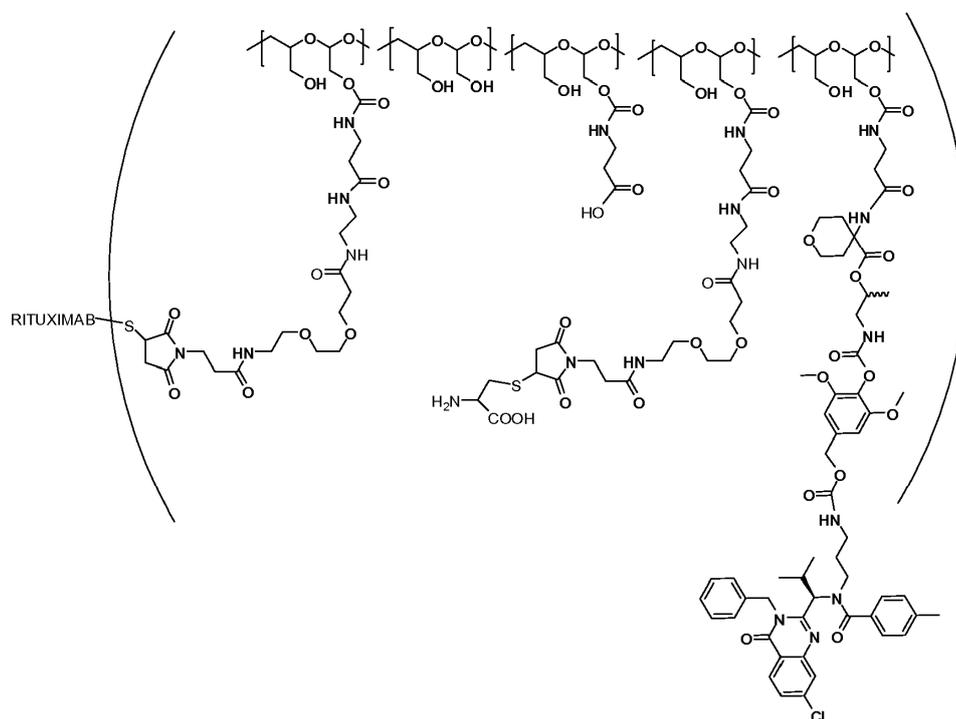
El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto que se usaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2,7%)-(THP-2-metil-Ispinesib) (2,4% mg, preparado de una manera similar al descrito en el Ejemplo 25), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 3.5:1. La relación de ispinesib a trastuzumab fue de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 8:1. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 4:1.

5

Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

10

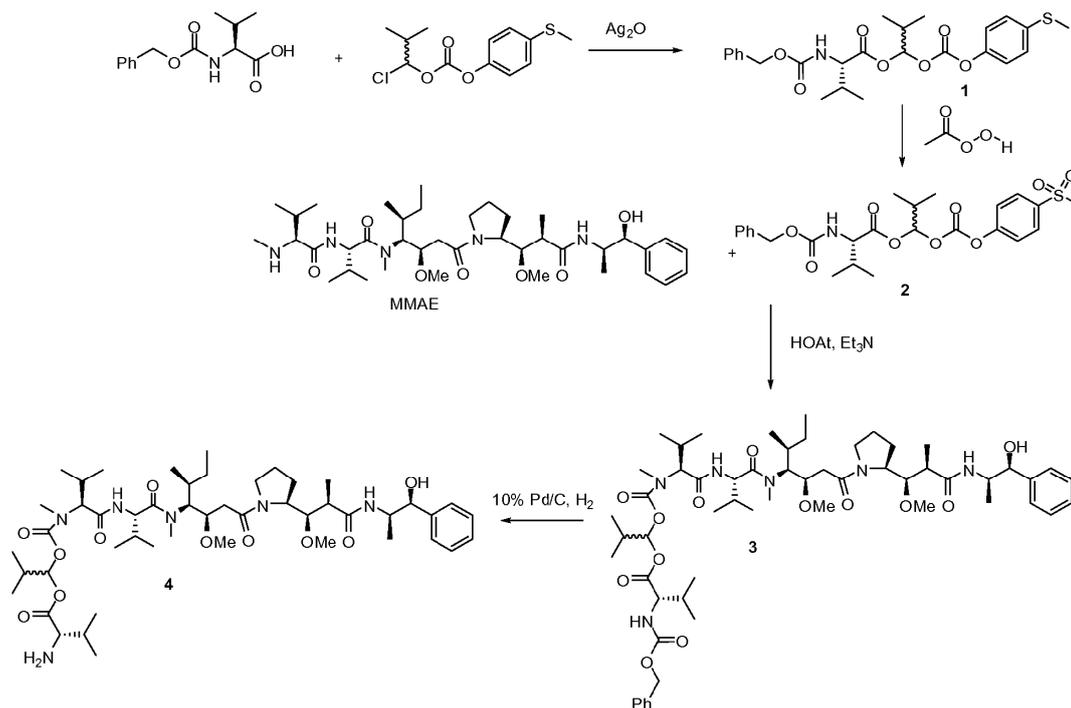
Ejemplo 27. Síntesis de Rituximab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(THP-2-metil-Ispinesib) (2.4%))



5 El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 26, excepto que se utilizaron rituximab y TCEP: rituximab 3.5:1. La relación promedio de ispinesib a rituximab fue de aproximadamente 4,5:1 a aproximadamente 7:1. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

10 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 28. Síntesis de valina aciloxiisopropiloxi-MMAE



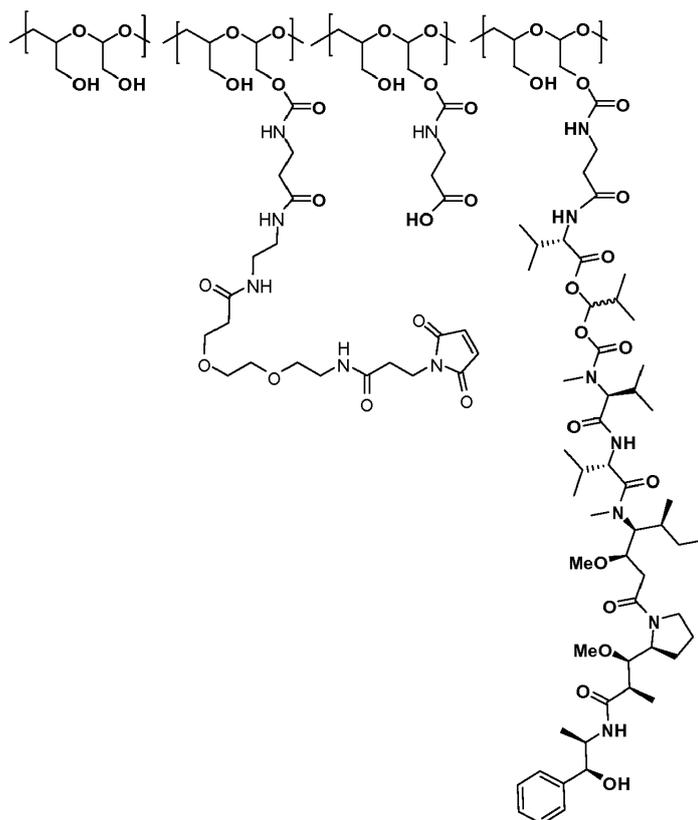
Compuesto 1: ácido (S)-2-(benciloxicarbonilamino)-3-metilbutanoico (4.76 g, 18.93 mmol), 1-cloro-2-metilpropil 4-(metilitio)fenil carbonato (2.6 g, 9.46 mmol) y monóxido de mono plata(I) mono plata(III) (2.193 g, 9.46 mmol) se calentaron a 90 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, el residuo se trituró con éter etílico y los sólidos se lavaron con éter. Los extractos orgánicos se lavaron con agua (4X), NaHCO₃ acuoso, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta obtener un aceite de color pajizo. El aceite crudo en DCM se purificó por cromatografía instantánea en sílica gel (Hexano: EtOAc 0% B a 20% B), seguido de HPLC en fase reversa C-18 utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua de 20-95% de acetonitrilo regulado con 0.1% de TFA para dar un aceite incoloro (2.78 g, 60% de rendimiento). El compuesto se caracterizó por 1H, ¹³C RMN y especificación de masa, M/z = 490.3.

Compuesto 2: a una solución enfriada con hielo del compuesto 1, (2.5 g, 5.11 mmol) en DCM (20 ml) se añadió gota a gota una solución de ácido peracético en ácido acético (12.14 g, 51.1 mmol) y se agitó durante 2 h, después de la adición se completó. La reacción se controló por LC/MS. Después de 2 h, a la mezcla de reacción se añadieron 25 ml de agua y se agitó en frío durante 30 minutos, los extractos orgánicos se diluyeron con 100 ml de DCM, se lavaron con agua helada (5x), NaHCO₃ acuoso, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea en sílica gel (Hexano: EtOAc 0% B a 50% B).

Compuesto 3: MMAE, (300 mg, 0.418 mmol), compuesto 2, (436 mg, 0.836 mmol), hidrato de 3H-[1,2,3] triazolo [4,5-b] piridin-3-ol (129 mg, 0.836 mmol) y THF (25 ml) se combinaron y se agitaron en un baño de hielo. A la mezcla resultante se le añadió trietilamina (0.291 ml, 2.089 mmol) y se agitó en frío durante 15 minutos, luego a 40 °C hasta que la reacción se completó según lo indicado por LC/MS. Después de 4 h, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con NaHCO₃ acuoso, ácido cítrico acuoso al 5%, se secó sobre Na₂SO₄, se concentró y se purificó por cromatografía en fase reversa para dar el compuesto 3 en forma de un sólido amorfo blanco como la sal de TFA. LC/MS, M/z = 1067.6.

Compuesto 4: al compuesto 3 (150 mg, 0.141 mmol) en THF (10 ml) y EtOH (10.00 ml) se burbujeó argón. A esta mezcla se le añadió paladio al 10% sobre carbono (29.9 mg, 0.028 mmol) seguido de la unión de un globo de hidrógeno (0.283 mg, 0.141 mmol) y la reacción se controló mediante LC/MS. Cuando se completó la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en fase reversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua regulada con TFA al 0.1% como fase móvil para dar el compuesto del título como un sólido amorfo blanco como la sal de TFA (56% de rendimiento). M/z = 933.6

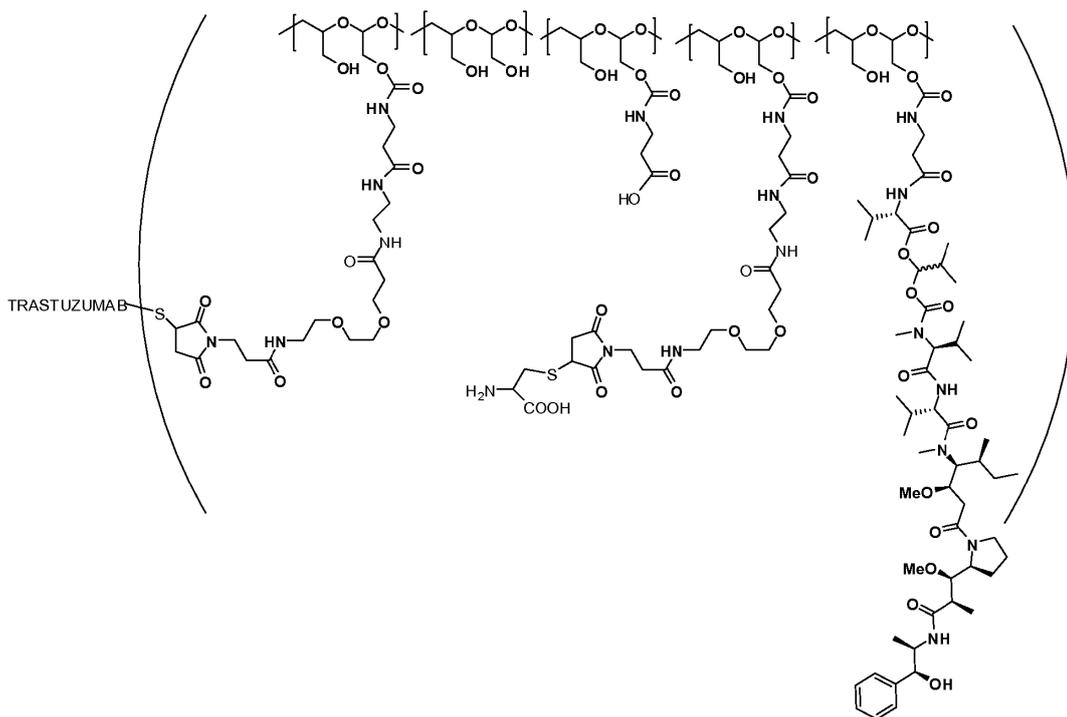
Ejemplo 29 Síntesis de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(valina aciloxiisopropiloxi-MMAE) (3%)



5 A una solución de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%) (20 mg, preparada de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2) en 1 ml de NMP se le añadió valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE (9.98 mg, preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 28). A esta mezcla se le añadió HOAt (5.41 mg), EDC.HCl (7.62 mg) y DIEA (3.1 mg). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y luego se añadió lentamente a una solución acuosa agitada de NaCl (1%, 50 ml). La mezcla cruda se purificó por diafiltración para dar el compuesto del título (rendimiento 21% basado en MMAE).

10 La carga de fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades poliméricas que contienen el fármaco) determinada por LC/MS fue del 3,1% en moles de las unidades estructurales poliméricas (o en promedio aproximadamente 2.2 MMAE-val-isopropil-aciloxiisopropiloxi moléculas por cadena de polímero). El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 8.3 kDa.

Ejemplo 30. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(valina aciloxiisopropiloxi-MMAE (3%))



5 Conjugado A: Trastuzumab -((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE) (3%)) se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7 excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE) (3%) (5.6 mg, preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 29), y TCEP TCEP:trastuzumab 3.5:1. La relación promedio de MMAE a trastuzumab fue de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 15:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 171 kDa.

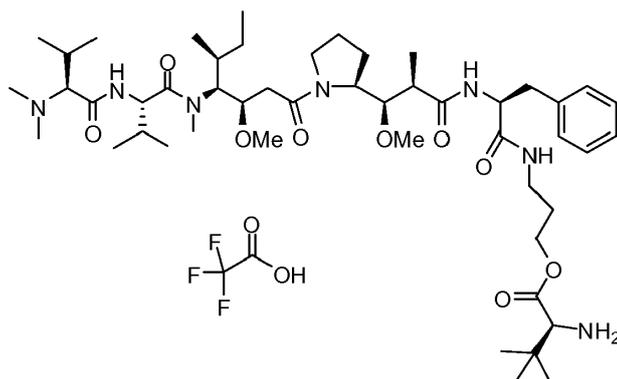
10 El conjugado B, Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE) (9%)) se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE) (9%) (31.7 mg, preparado usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 30), trastuzumab (57 mg), TCEP:trastuzumab 3.5:1. La relación promedio de MMAE a trastuzumab fue de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 16.5:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 224 kDa.

15 Conjugado C: Rituximab -((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE) (9%)) se preparó sustituyendo rituximab reducido en el procedimiento descrito anteriormente para Conjugado A. La relación MMAE a rituximab fue de aproximadamente 9.5:1 a aproximadamente 13:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 202 kDa.

20 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 31. Síntesis de trifluoroacetato de t-butilglicina AF-HPA

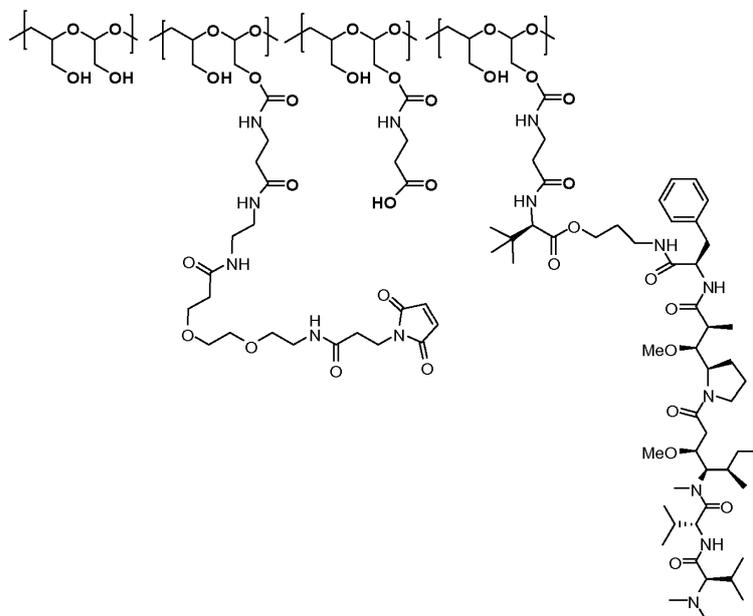
25



5 A la solución enfriada con hielo de ácido (R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-3,3-dimetilbutanoico (67.6 mg, 0.292 mmol) en DCM (5 ml) se le añadió DCC (0.046 ml, 0.292 mmol) y la mezcla de reacción se agitó en frío durante 15-20 min. Por separado, se enfriaron AF-HPA (134 mg, 0.146 mmol, preparado de una manera similar a la descrita en la Patente U.S. No. 8,685,383, Ejemplo 18) y DMAP (53.6 mg, 0.438 mmol) en DCM (5 ml), los dos Las mezclas de reacción se combinaron y se agitaron en frío durante 20-30 min, luego a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se controló por LC/MS. Después de cuatro horas, la LC/MS indicó que la reacción no estaba completa. Se añadió una segunda parte alícuota del éster DCC activado con aminoácido (1 eq de cada uno en DCM) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente, seguido de purificación por HPLC usando un gradiente de acetonitrilo al 25-90%/agua con el móvil. Fase regulada con TFA al 0.1%. La AF-HPA-Boc-t-butilglicina se obtuvo como un sólido blanco amorfo como la sal de TFA (85% de rendimiento). M/z = 1016.6.

10 A una solución enfriada con hielo de AF-HPA-Boc-t-butilglicina, (140 mg, 0.124 mmol) en DCM (5 ml) se le añadió TFA (0.477 ml, 6.19 mmol) y la mezcla de reacción se agitó en frío durante 1 h. a temperatura ambiente hasta que se completó según lo indicado por LC/MS. La mezcla se concentró y el residuo resultante se purificó por purificación por HPLC usando un gradiente de acetonitrilo/agua de acetonitrilo al 10-90% regulado con TFA al 0.1% utilizado como fase móvil. El compuesto del título se obtuvo como un sólido amorfo blanco como la sal TFA. M/z = 917.6

Ejemplo 32 Síntesis de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(t-butilglicina AF-HPA) (7.5%)

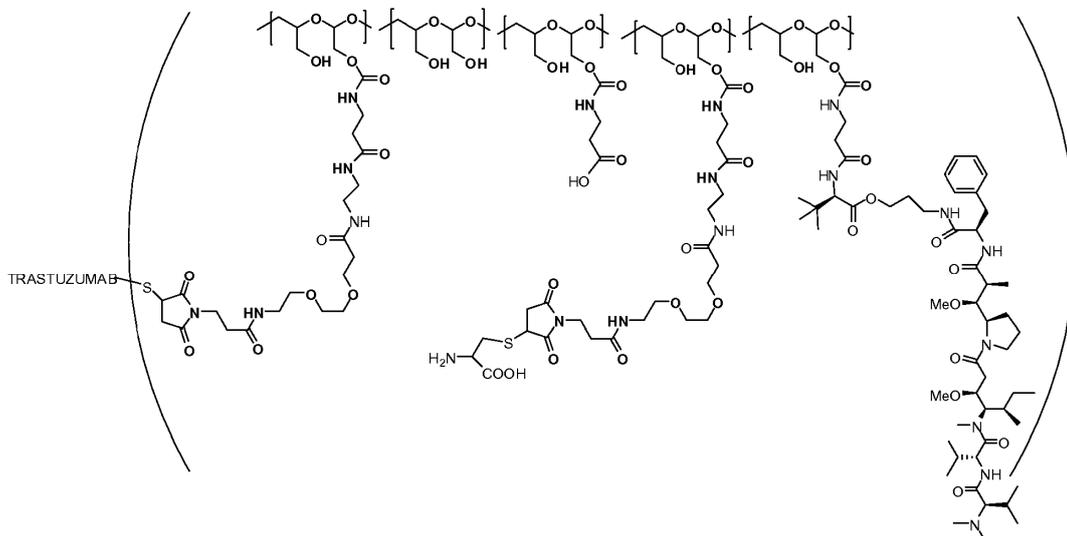


20 A una solución enfriada con hielo de 10K PHF-BA (28%)- PEG2-MI (2.7%) (137 mg, 10,84 μ mol, preparada de manera similar a la descrita en el Ejemplo 2) en agua (5,5 ml) y NMP (1.375 ml) se añadió AF-HPA-t-butilglicina (67 mg, 0.065 mmol, preparada de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 31) y la mezcla resultante se agitó en frío durante 15 minutos, seguido de la adición de 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (15.59 mg, 0.135 mmol). A la mezcla de reacción se le añadió EDAC (51.9 mg, 0.271 mmol). Después de 30 minutos, se añadió una segunda adición de la misma cantidad de reactivo. Después de 4 h, el pH se ajustó a 5.6 con NaHCO_3 0,1N, y se añadió una alícuota adicional de EDAC (50 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. El producto se purificó por filtración en gel y HPLC en fase reversa.

La carga de fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades poliméricas que contienen el fármaco) determinada por $^1\text{H-RMN}$ fue del 7.5% en moles de las unidades estructurales poliméricas (o en promedio de aproximadamente 5.7 moléculas de t-butilglicina AF-HPA por cadena de polímero).

Ejemplo 33. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(t-butilglicina AF-HPA) (7.5%))

5



10

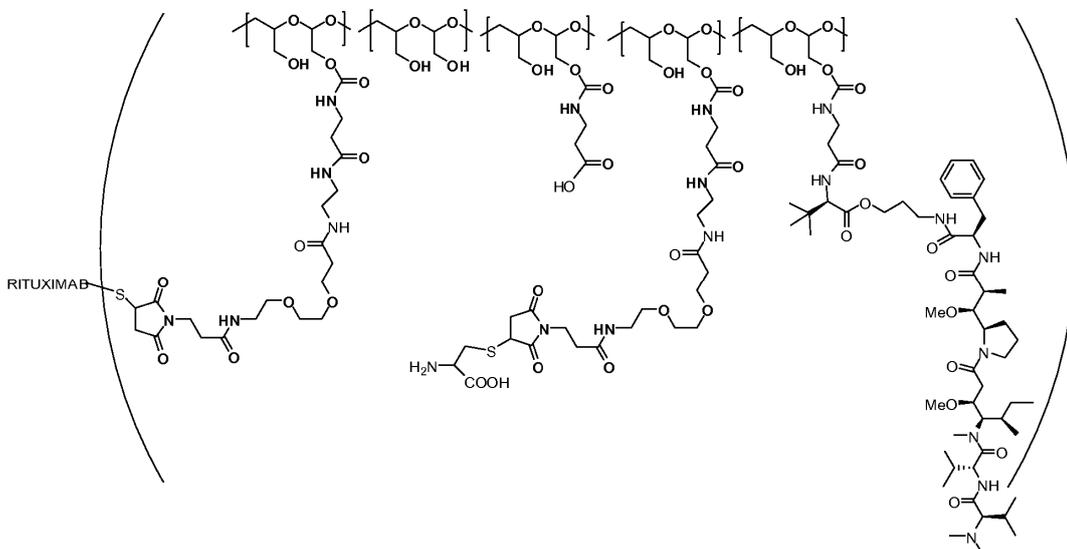
El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2,7%)-(t-butilglicina AF-HPA) (7,5%) (45,7 mg, preparado en de manera similar a la descrita en el Ejemplo 32), trastuzumab TCEP: trastuzumab 3.5:1. La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 6:1. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 215 kDa.

15

Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gentuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 34. Síntesis de Rituximab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(t-butilglicina -AF-HPA) (7.5%))

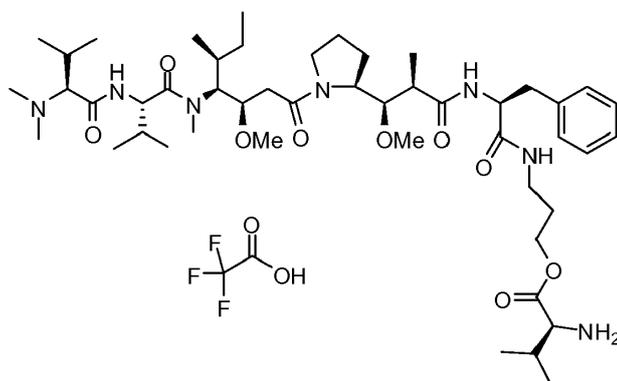
20



El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 33, excepto que se utilizaron rituximab y TCEP: rituximab 3.5:1. La relación promedio de AF-HPA a rituximab fue de aproximadamente 2.5:1 a aproximadamente 3.5:1. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 202 kDa.

- 5 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco
- 10 conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 35. Síntesis de trifluoroacetato de val-AF-HPA

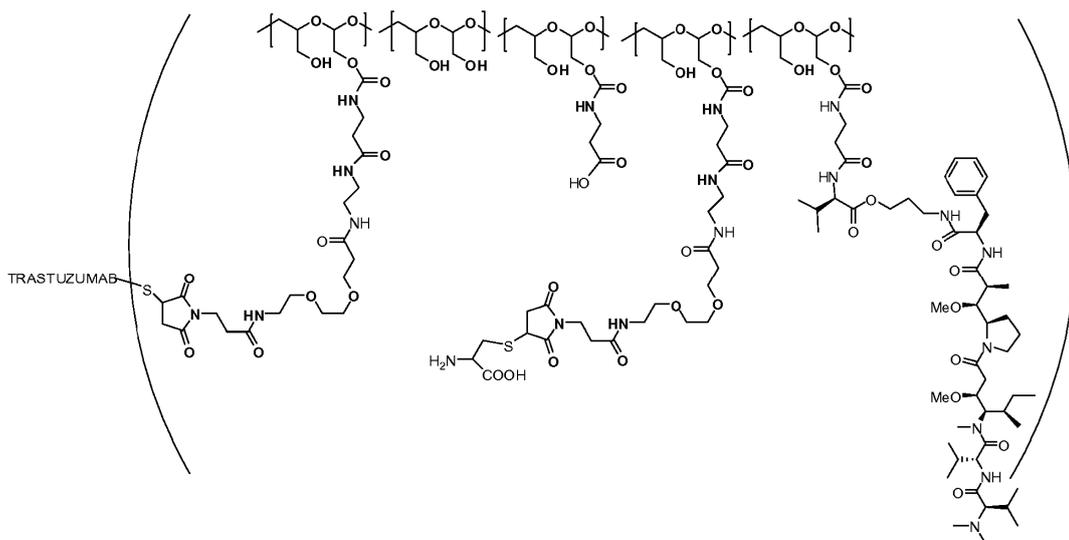


- 15 La AF-HPA-Boc-valina se preparó de manera similar a la descrita en el Ejemplo 31, excepto que se usó el ácido (R)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-3-metilbutanoico (63.5 mg, 0.292 mmol). AF-HPA -Boc-valina se obtuvo como un sólido amorfo blanco como la sal de TFA (85% de rendimiento). M/z = 1002.6.

El compuesto del título se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 31, excepto que se usó AF-HPA-Boc-valina (128 mg, 0,115 mmol) para dar 106 mg, 91% de rendimiento. M/z = 903.3

Ejemplo 36. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(val-AF-HPA) (7.2%))

20



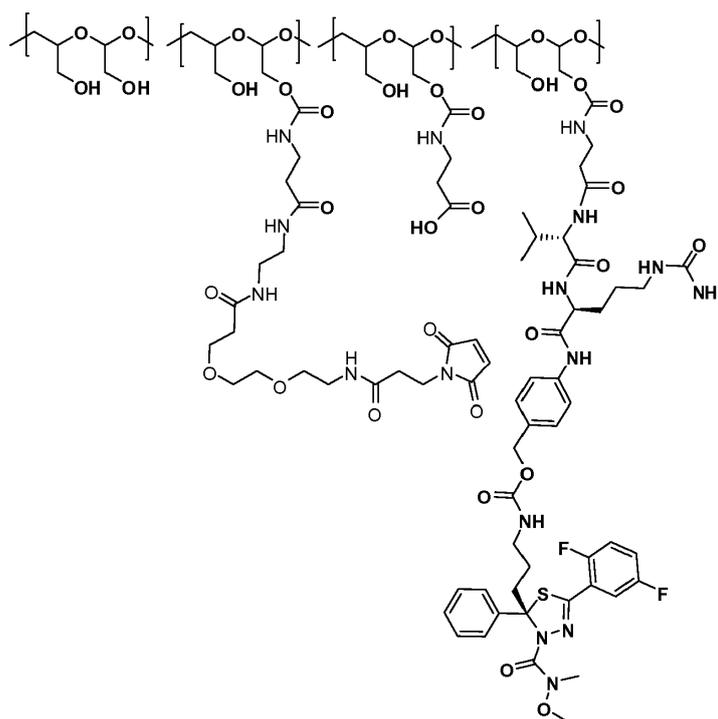
- 25 El compuesto del título se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(val AF-HPA) (7.2%) (52.3 mg, preparado usando el procedimiento descritos en el Ejemplo 32), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 3.5:1. La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 14.5:1 a aproximadamente 20:1. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab

fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 235 kDa.

Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 37. Síntesis de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520) (2.9%)

10



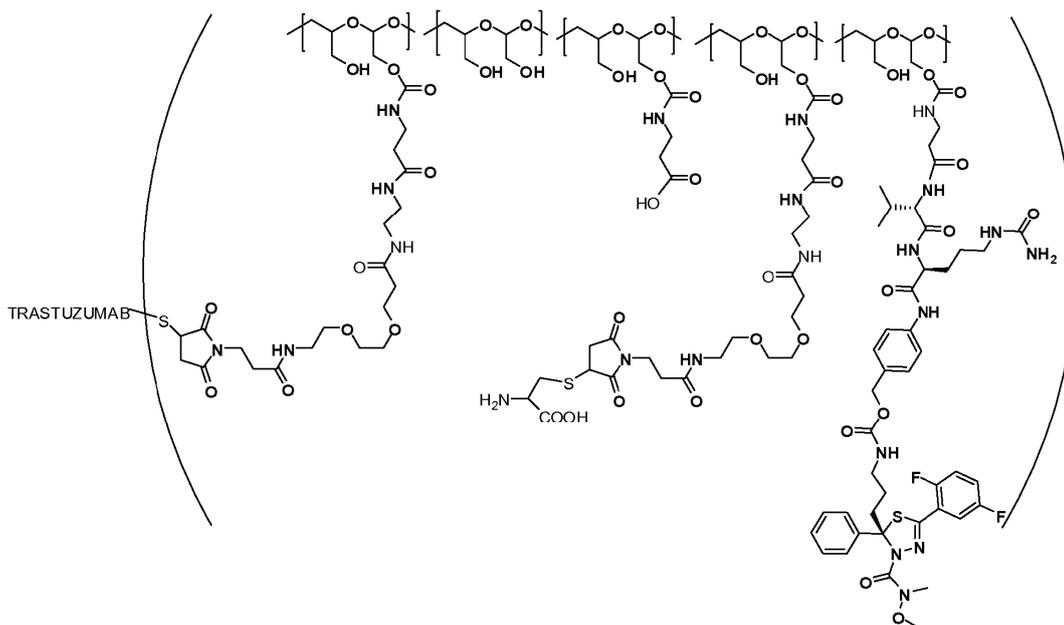
A una solución de 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.7%)-(252 mg, preparada de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2) en 23 ml de NMP se añadió Arry 520-PABA-Val- Cit-NH₂ (37.6 mg, preparado usando el procedimiento descrito en la Patente U.S. No. 8,815,226, Ejemplo 84) en NMP (1 ml). A esta mezcla se le añadió HATU (22,8 mg) en NMP (1 ml) seguido de DIEA (20,7 mg). La mezcla de reacción se agitó 30 min a temperatura ambiente. La mezcla cruda se purificó por diafiltración para dar el compuesto del título (47% de rendimiento basado en Arry 520).

15

La carga de fármaco del producto conjugado (es decir, el contenido de unidades poliméricas que contienen el fármaco) determinada por UV fue del 2.9% en moles de las unidades estructurales poliméricas (o en promedio de aproximadamente 2.1 moléculas Arry 520-PABA-Val-Cit por cadena de polímero). El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 9.0 kDa.

20

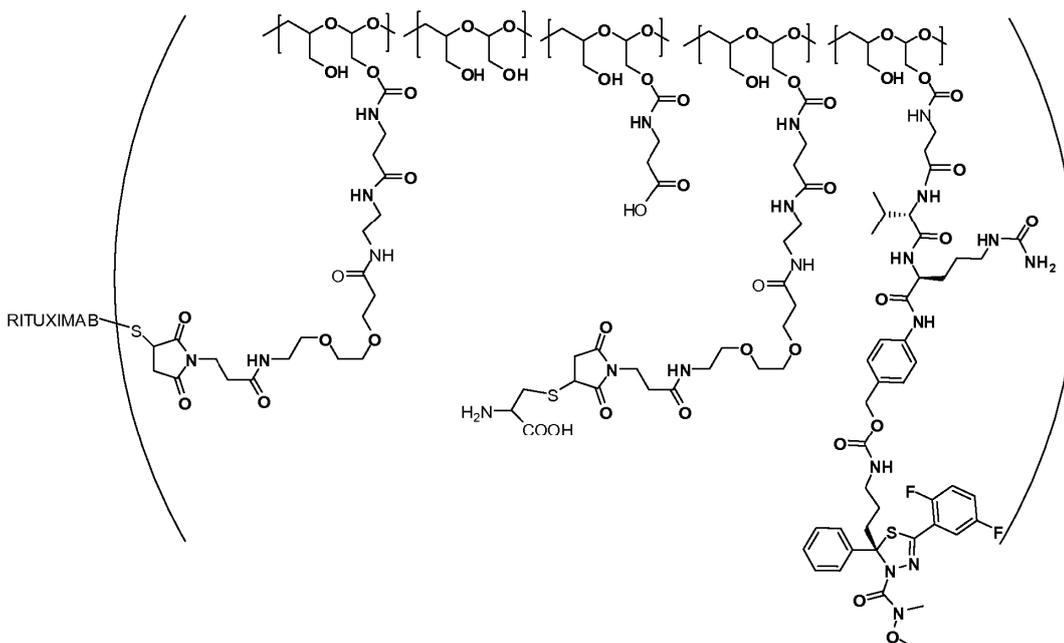
Ejemplo 38. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520) (2.9%))



El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2,7%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520) (2,9%) (55,6 mg). preparados de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 38), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 2.5:1. La relación de Arry 520 a trastuzumab fue de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 6:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 245 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tal como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

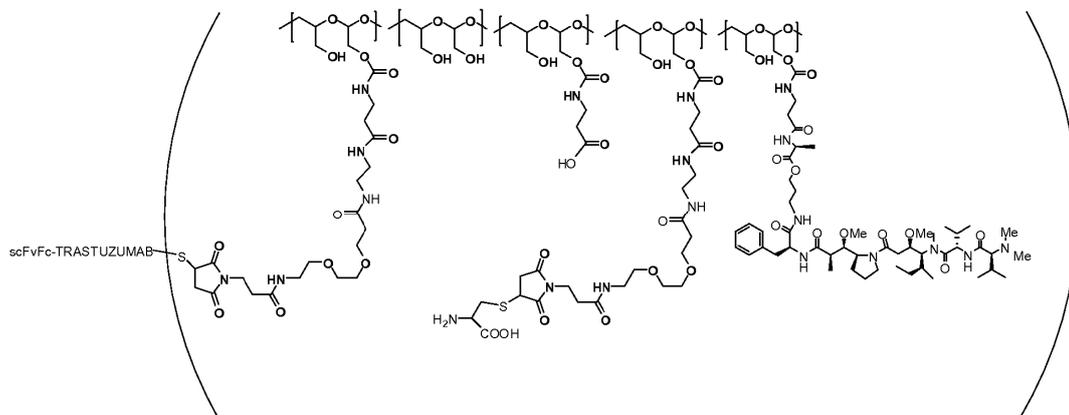
Ejemplo 39. Síntesis de Rituximab-((EG2-MI (2.7%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520 (2.9%))



El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 38, excepto que se utilizaron rituximab y TCEP: rituximab 2.5:1. La relación promedio de Arry 520 a rituximab fue de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 6:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 231 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

- 5 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina como se describe anteriormente. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 40. Síntesis de sc-FvFc-Trastuzumab-((EG2-MI (2.8%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8%))



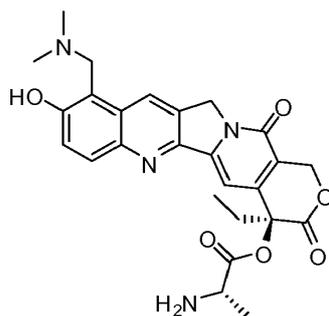
- 15 El compuesto del título ("conjugado de scFvFc-trastuzumab polímero fármaco", o "trastuzumab scADC") se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 4 o en el Ejemplo 7 excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%)-EG2-MI (2.8 %)- AF-HPA-Ala (8%) (2.2 mg preparados de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 3 o Ejemplo 6) y el anticuerpo scFvFc trastuzumab y el anticuerpo TCEP: scFvFc trastuzumab 3:1. La secuencia del anticuerpo scFvFc trastuzumab (anticuerpo de cadena simple trastuzumab-proteína de fusión Fc) es la publicada en Olafsen et al (Cancer Res. 65 (13): 5907-16, 2005) con tres modificaciones en las regiones constantes: la bisagra tiene una mutación (C-> S) para eliminar la cisteína no pareada que usualmente se une con la constante de la cadena ligera (Yang and Rader, Cloning, Expression, and Purification of Monoclonal Antibody in scFv-Fc Format. Antibody Methods and Protocols. Ed. Proetzel and Ebersback, 2012). Las otras dos modificaciones también están en la secuencia de IgG1. Olafsen et al 2005, crearon el mutante doble Trastuzumab-scFv-Fc (H310A, H435Q) para acortar la vida media del fragmento de anticuerpo con el fin de mejorar la imagen. Las modificaciones se reversionaron de nuevo a la secuencia canónica de IgG1.

La relación de anticuerpos AF-HPA a scFvFc trastuzumab fue de aproximadamente 14:1 a aproximadamente 19:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 182 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco y scFvFc trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

- 30 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM que varían el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 41. Topotecan-alanina

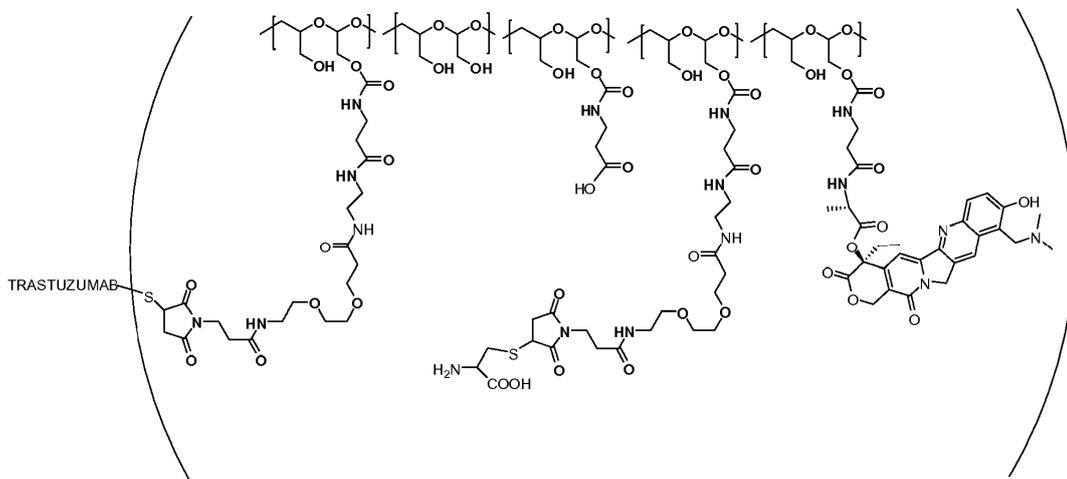
35



- 5 Topotecan (0.500 g, 1.19 mmol), BOC-ala-OH (0.449 g, 2.37 mmol) y N, N-dimetilpiridin-4-amina (0.145 g, 1.19 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ anhidro (5.93 mL). Se añadió N,N'-metanodilidenciclohexanamina (DCC) (0.580 g, 2.81 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se agregó DCC adicional (300 mg, 1.45 mmol) y la mezcla se agitó durante 48 horas. Los sólidos se eliminaron por filtración y la solución se lavó con HCl 0.1 N (2 x 5 ml), agua (5 ml) y salmuera (5 ml), luego se secó sobre MgSO₄, seguido de RP-HPLC eluyendo con TFA al 0.1%/CH₃CN: 0.1% de TFA/agua (combiflash, C18, columna de 100 G; 5 min. 0% de B, rampa a 100% de B durante 20 min) para dar Topotecan-BOC-alanina como un sólido (186.6 mg, 0.315 mmol, 26.5% de rendimiento).
- 10 Topotecan-BOC-alanina (186.6 mg, 0.315 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (1.5 mL). Se añadió ácido 2,2,2-trifluoroacético (1.205 ml, 15.74 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de RP-HPLC (C18, HPLC eluyendo con TFA al 0.1%: AcN/TFA al 0,1%; agua) para dar el compuesto del título como un sólido naranja/amarillo (93.0 mg, 0.189 mmol, 60.0% de rendimiento).

Ejemplo 42. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.4%)-(10 kDa PHF-BA (22.3%)-(topotecan alanina) (6.5%))

15



- 20 Conjugado A: Trastuzumab -((EG2-MI (2.4%)-(10 kDa PHF-BA (22.3%)-(topotecan alanina) (6.5%)) se preparó usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o Ejemplo 7, excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (22.3%) EG2-MI (2.4%)-(topotecan alanina) (6.5%) (19,3 mg, teniendo un promedio de aproximadamente 4.2 moléculas de topotecán por cadena de polímero, preparadas utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 3:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 256 kDa. La relación promedio de topotecan a trastuzumab fue de aproximadamente 19:1 a aproximadamente 26:1. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1.
- 25 Conjugado B: Rituximab -((EG2-MI (2.4%)-(10 kDa PHF-BA (22.3%)-(topotecan alanina) (13%)) se preparó sustituyendo rituximab reducido en el procedimiento descrito anteriormente. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 212 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a rituximab fue de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 22:1.

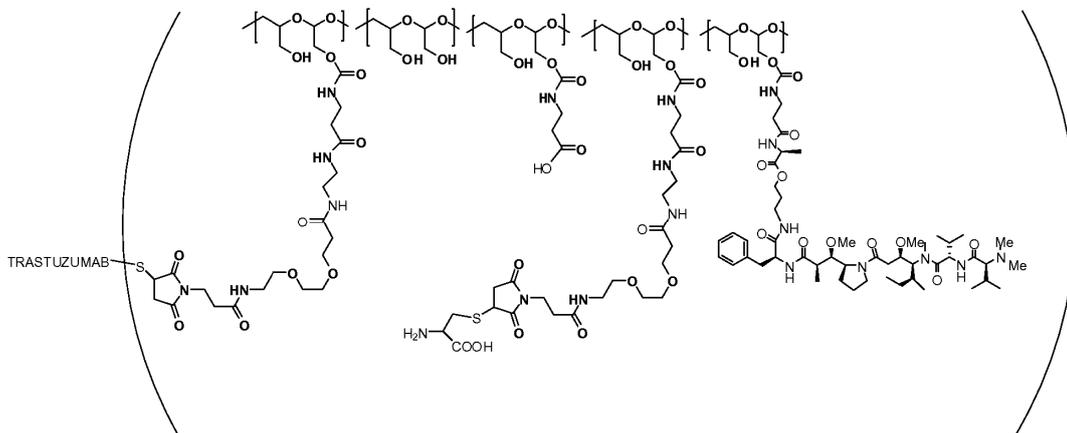
30 Trastuzumab -((EG2-MI)-(10 kDa PHF-BA)-(topotecan valina) se prepara usando el procedimiento descrito anteriormente, excepto que se utilizó 10K PHF-BA EG2-MI-(topotecan valina), preparado usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 41.

Otros conjugados de fármacos PBRM se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que incluyen otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab,

rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anti Anticuerpos de la meothelin como se describe anteriormente También se obtienen conjugados de fármaco PBRM con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco.

Ejemplo 43. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI (2.8%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (7.3%))

5



El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 o el Ejemplo 7, excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2,8%)-(HPV-Ala (7,2%)) (8,36 mg, preparado de una manera similar a que como se describe en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 2.5:1.

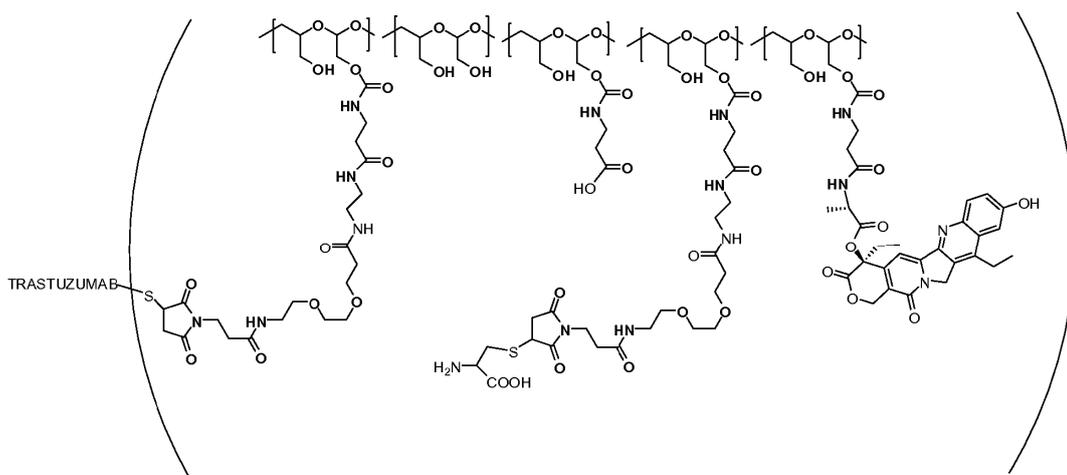
10 Conjugado A: Trastuzumab-((EG2-MI (2,8%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (7,3%))). La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 183 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

15 Conjugado B: Trastuzumab -((EG2-MI (2.5%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.4%)) se preparó de una manera similar a la que se describe en este ejemplo anterior excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2.5%)-(HPV-Ala (8.4%)) (preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 3.5:1. La relación de AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 17:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 218 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

20 Conjugado C: Trastuzumab -((EG2-MI (2.5%)-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.4%)) se preparó de una manera similar a la que se describe en este ejemplo excepto que se utilizaron 10K PHF-BA (28%) EG2-MI (2,8%)-(HPV-Ala (8,4%)) (preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 6), trastuzumab y TCEP: trastuzumab 2,75:1. La relación AF-HPA a trastuzumab fue de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 16:1. El peso molecular del conjugado del título fue de aproximadamente 247 kDa. La relación promedio de conjugado de PHF-fármaco a trastuzumab fue de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

25 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti- 5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrilo de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

30 Ejemplo 44. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI)-(10 kDa PHF-BA)-(SN38 alanina)

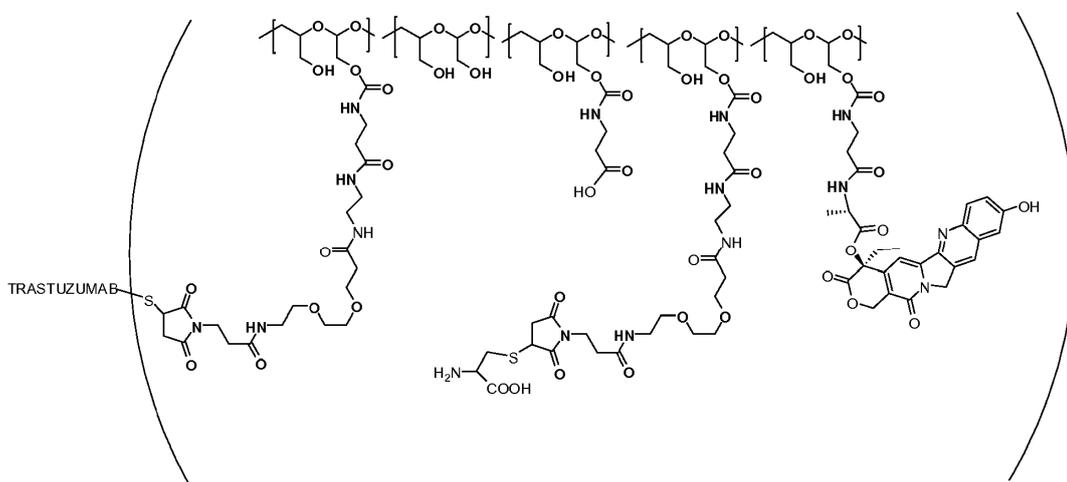


El compuesto del título se prepara utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 42, excepto que se utilizan 10K PHF-BA EG2-MI-(alanina SN38), preparados utilizando el procedimiento descrito en los Ejemplos 42 y 41.

- 5 Trastuzumab -((EG2-MI)-(10 kDa PHF-BA)-(SN-38 valina) se prepara usando el procedimiento descrito anteriormente, excepto que se utilizan 10K PHF-BA EG2-MI-(SN-38 valina), preparado usando el procedimiento descrito en los Ejemplos 41 y 42.

- 10 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

Ejemplo 45. Síntesis de Trastuzumab-((EG2-MI)-(10 kDa PHF-BA)-(camptotecin-alanina)



- 15 El compuesto del título puede prepararse usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 42, excepto que se usan 10K PHF-BA EG2-MI-(camptotecina alanina), preparado usando el procedimiento descrito en los Ejemplos 42 y 41.

Trastuzumab -((EG2-MI)-(10 kDa PHF-BA)-(camptotecina valina) se prepara usando el procedimiento descrito anteriormente, excepto que se utilizan 10K PHF-BA EG2-MI-(camptotecina valina), preparado usando el procedimiento descrito en los Ejemplos 41 y 42.

- 20 Otros conjugados de PBRM-polímero-fármaco se sintetizan con métodos similares al procedimiento descrito anteriormente, que involucran otros derivados de PBRM, tales como, por ejemplo, la forma parcialmente reducida de cetuximab, rituximab, bevacizumab, nimotuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, lintuzumab, anti-5T4 o anticuerpos anti-mesotelina. También se obtienen conjugados de PBRM-polímero-fármaco con relaciones variables de fármaco a PBRM variando el número de grupos sulfhidrido de PBRM y la carga de fármaco conjugado de fármaco-polímero.

- 25 Ejemplo 46. Ensayo de viabilidad celular para conjugados de PBRM-polímero-polímero

Los conjugados de PBRM-polímero-fármaco se evaluaron para determinar sus propiedades antiproliferación en líneas de células tumorales in vitro utilizando Cell Titer-Glo (Promega Corp). Las células se colocaron en placas de 96 pozos de paredes negras y se dejaron adherir durante la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. SKBR3, BT474, células NCI-N87 (células que expresan HER2), células MCF7 (células de niveles bajos de expresión de HER2) y células JIMT1 (células de nivel medio de expresión de HER2) se sembraron a una densidad de 5,000 células por pozo. Al día siguiente, el medio se reemplazó con 50 µL de medio fresco y se agregaron a los pozos apropiados 50 µL de reservas 2x de conjugado de PBRM-polímero-fármaco, conjugado de fármaco-polímero o fármaco, se mezclaron y se incubaron durante 72 h. Se añadió reactivo Cell Titer-Glo a los pozos a temperatura ambiente y se midió la señal luminiscente después de 10 minutos utilizando un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices). Las curvas de respuesta a la dosis se generaron utilizando el software SoftMax Pro. Los valores de IC₅₀ se determinaron a partir del ajuste de la curva de cuatro parámetros.

Las células que expresan CD33 HL-60 se pasaron a una densidad de 5,000 células por pozo y se trataron con conjugado de PBRM-polímero-fármaco el mismo día. Después de 72 h de incubación, las células se analizaron utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Las células de expresión de OVCAR-3, TF-1α y HCT-15 se colocaron en placas y se analizaron utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Las líneas celulares A431 que expresan 5T4 (A431, una línea celular de carcinoma epidermoide disponible en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas Virginia, EE. UU., con el número de acceso ATCC®CRL-1555); PC3 (una línea celular de próstata humana, ATCC® CRL-1435), MDAMB231-5T4 OE y células que expresan LLC1 de línea celular de control negativo objetivo (células de carcinoma de pulmón negativas para la expresión de 5T4) se colocaron en placas y se analizaron utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente. "MDAMB231-5T4 OE" significa células MDA-MB-231 recombinantes que sobreexpresan 5T4 (generadas por transfección estable; divulgadas en la Solicitud Provisional U.S. Número 61/835,858, presentada el 17 de junio de 2013).

Las Tablas I a III son resultados ilustrativos de las propiedades antiproliferación del conjugado de PBRM-polímero-fármaco ya sea en células que expresan HER2 (Tablas I), células que expresan CD33 (Tabla II) o células que expresan 5T4 (Tabla III)

La Tabla IV son resultados ilustrativos de las propiedades antiproliferación del fármaco, AF-HPA en líneas celulares OVCAR-3 y TF-1α.

La tabla I enumera los resultados para el conjugado de PBRM-polímero-fármaco Trastuzumab-((EG2-MI (3%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 12:1 a 17:1), Ejemplo 4; Trastuzumab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 16:1 a aproximadamente 21:1), Ejemplo 7; Trastuzumab-((EG2-MI (1%))-(10 kDa PHF-GA (29%)-(AF-HPA-Ala (6%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 18:1 a aproximadamente 23:1), Ejemplo 13; Trastuzumab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1), Ejemplo 14; Trastuzumab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 11:1 a aproximadamente 16:1), Ejemplo 15; y Rituximab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 13:1 a aproximadamente 18:1), Ejemplo 16; Trastuzumab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1), Ejemplo 17; Trastuzumab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 19:1 a aproximadamente 24:1), Ejemplo 18A; (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 20:1 a aproximadamente 25:1), Ejemplo 18B; (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 23:1 a aproximadamente 28:1), Ejemplo 18C; Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(HPV-Ala (14%))), Ejemplo 20A; Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(HPV-Ala (7.7%))), Ejemplo 20B; Trastuzumab-((EG2-MI (3.5%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(HPV-Ala (4.3%))), Ejemplo 20C; sc-FvFc-Trastuzumab-((EG2-MI (2.8%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8%))), Ejemplo 40; Trastuzumab-((EG2-MI (2.8%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (7.3%)) AF-HPA :trastuzumab aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1), Ejemplo 43A; Trastuzumab-((EG2-MI (2.5%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.4%))), AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 12:1 a aproximadamente 16:1), Ejemplo 43C; fármaco libre (AF-HPA); y Kadcyła®.

Tabla I

	BT474 IC ₅₀ (nmol/L)	SKBR3 IC ₅₀ (nmol/L)	N87 IC ₅₀ (nmol/L)	MCF7 IC ₅₀ (nmol/L)	JIMT1 IC ₅₀ (nmol/L)
Ejemplo 4	0.05	0.02	0.03	40	0.14
Ejemplo 7	0.03	0.01	0.05	3.6	0.11
Ejemplo 13	0.12	0.03	0.05	7.7	0.28

ES 2 754 397 T3

	BT474 IC ₅₀ (nmol/L)	SKBR3 IC ₅₀ (nmol/L)	N87 IC ₅₀ (nmol/L)	MCF7 IC ₅₀ (nmol/L)	JIMT1 IC ₅₀ (nmol/L)
Ejemplo 14	0.07	0.02	0.11	28.9	0.13
Ejemplo 15	0.05	0.01	0.11	23.5	0.12
Ejemplo 16	3.04	1.44	5.23	27.9	1.88
Ejemplo 17	0.03	0.03	0.43	28.8	0.06
Ejemplo 18A	0.04	0.02	0.06	9.6	0.16
Ejemplo 18B	0.05	0.01	0.04	33	0.12
Ejemplo 18C	0.03	0.02	0.06	3.8	0.18
Ejemplo 20A	0.01	0.07	0.31	2.86	0.67
Ejemplo 20B	0.15	0.79	4.07	100	6.51
Ejemplo 20C	0.76	0.79	4.49	10	9.73
Ejemplo 40	ND	0.02	0.10	>100	0.90
Ejemplo 43A	0.03	0.03	0.43	28.84	0.60
Ejemplo 43C	0.10	0.02	0.09	>100	0.64
AF-HPA (toxin equivalents)	1.01	0.40	0.42	4.4	0.86
Kadcyla®	2.40	0.23	0.09	38.6	18.0
ND = no determinado					

5 Los resultados en la Tabla I muestran que, para las líneas celulares que expresan HER2 SKBR3, BT474, N87 y JIMT1, los conjugados de PBRM-polímero-fármaco (Ejemplo 4, Ejemplo 7, Ejemplos 13 a 15, Ejemplo 17, Ejemplos 18A a 18C, Ejemplo 20A, Ejemplo 43A y el Ejemplo 43C) mostraron una mayor actividad antiproliferativa en comparación con la línea celular MCF7 que expresa bajo HER2 y en comparación con el conjugado PBRM-polímero-fármaco de control (Ejemplo 16) o Kadcyla®.

10 La Tabla II lista los resultados para Lintuzumab -((EG2-MI (2%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA: lintuzumab aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1), Ejemplo 8 y Rituximab -((EG2-MI (3%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%)) (AF-HPA: rituximab de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 18:1), Ejemplo 9 y fármaco libre (AF-HPA).

Tabla II

	HL-60 IC ₅₀ (nmol/L)
Ejemplo 8	0.77
Ejemplo 9	6.74

	HL-60 IC ₅₀ (nmol/L)
AF-HPA	4.8

Los resultados en la Tabla II muestran que, para la línea celular HL-60 que expresa CD33, el conjugado de PBRM-polímero-fármaco (Ejemplos 8) exhibió una mayor actividad antiproliferativa en comparación con el conjugado de PBRM-polímero-fármaco de control (Ejemplo 9).

- 5 La Tabla III lista los resultados para el conjugado de PBRM-polímero-fármaco Anti-5T4 -((EG2-MI (3%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))), (AF-HPA: anti-5T4 de aproximadamente 12:1 a aproximadamente 18:1), Ejemplo 10 y Rituximab-((EG2-MI (3%)-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))), (AF-HPA: rituximab de aproximadamente 13:1 a aproximadamente 18:1), Ejemplo 9 y fármaco libre (AF-HPA).

Tabla III

	A431 IC ₅₀	PC3 IC ₅₀	LLC1 IC ₅₀	MDAMB231OE
	(nmol/L)	(nmol/L)	(nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)
Ejemplo 10	0.3, 0.3*	0.6	16.9, >100*	0.04
Ejemplo 9	1.8, 0.9*	9.3	5.3, 33*	ND
AF-HPA	0.7, 0.9*	2.5	1.6, >100*	ND
ND: no determinado.				
* Resultados de dos experimentos diferentes.				

10

Los resultados en la Tabla III muestran que, para las líneas celulares A431, PC3 y MDAMB231OE que expresan 5T4, el conjugado de PBRM-polímero-fármaco (Ejemplo 10) exhibió una mayor actividad antiproliferativa en relación con el conjugado de fármaco PBRM de control (Ejemplo 9) y las células diana que no expresan LLC1.

La Tabla IV lista los resultados para el fármaco libre (AF-HPA).

15

Tabla IV

	OVCAR3 IC ₅₀ (nmol/L)	TF-1 α IC ₅₀ (nmol/L)
AF-HPA	0.8	13.8

Ejemplo 47. Estudios de unión de ligandos por resonancia de plasmón de superficie BIAcore (SPR)

- 20 La unión cinética del conjugado de PBRM-polímero-fármaco a un receptor inmovilizado se determina mediante BIAcore SPR. Las constantes de unión para la PBRM en el conjugado de PBRM-polímero-fármaco y PBRM sola se pueden determinar usando procedimientos estándar BIAcore.

- 25 Usando la química de acoplamiento de aminas estándar, hErbB2 se inmoviliza en tres canales de flujo a la superficie del chip del sensor de resonancia de Plasmon de superficie en tres densidades similares. El trastuzumab se une fácilmente al hErbB2 inmovilizado, lo que demuestra que ambos miembros de unión estaban activos. Los parámetros de unión k_a (asociación o constante de tasa de afinidad) y K_D (constante de disociación) se miden a 25 °C para el conjugado de PBRM-polímero-fármaco y PBRM utilizando un biosensor óptico BioRad ProteOn XPR36 equipado con un chip sensor GLC y equilibrado con regulador de ejecución.

Los resultados muestran que la PBRM en el conjugado de PBRM-polímero-fármaco es reconocido por el receptor de PBRM y que la unión de la PBRM en el conjugado de PBRM-fármaco-polímero no se ve afectada significativamente en relación con la PBRM no conjugada.

Ejemplo 48. Ensayo de unión de FACS

Se evaluó la unión a la superficie celular del conjugado de PBRM-polímero-fármaco Trastuzumab -((EG2-MI (3%))- (10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))), (AF- HPA: trastuzumab aproximadamente 12:1 a 17:1), Ejemplo 4, utilizando el citómetro digital de flujo de sobremesa MACSQuant® Analyzer 10 en diferentes líneas celulares de cáncer humano. Se incubaron 100,000 células en suero de cabra al 6% en hielo. Se añadió el conjugado de PBRM-polímero-fármaco o PBRM no conjugado a las células y se incubaron en hielo durante tres horas, luego se lavaron las células con PBS enfriado con hielo y se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados de manera fluorescente en hielo durante una hora. Una vez completadas, las células se lavaron con PBS, se fijaron con 1% de paraformaldehído y se analizó mediante un citómetro de flujo. La unión a la superficie celular del conjugado de PBRM-polímero-fármaco se determinó mediante titulación y se comparó con la de PBRM no conjugada.

La tabla V proporciona la constante de unión (K_d) del conjugado de PBRM-polímero-fármaco Trastuzumab -((EG2-MI (3%))- (10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))), (AF-HPA: trastuzumab alrededor de 12:1 a 17:1), Ejemplo 4, y trastuzumab solo para células JIMT-1.

Tabla V

	K_d (nM)
Ejemplo 4	2.16
Trastuzumab	0.92

Los resultados muestran que la unión a la superficie celular de la PBRM en el conjugado de PBRM-polímero-fármaco fue comparable a la de la PBRM no conjugada.

La unión a la superficie celular de la PBRM en otros conjugados de PBRM-fármaco-polímero a otras células cancerosas humanas puede determinarse y debe ser comparable a la de la PBRM no conjugada.

Ejemplo 49. Estudios de unión de ligandos por resonancia de plasmón de superficie BIAcore (SPR)

La unión cinética del conjugado de PBRM-polímero-fármaco a un receptor inmovilizado se determinó por BIAcore SPR. Las constantes de unión para el PBRM en los conjugados de PBRM-polímero-fármaco tales como Trastuzumab-((EG2-MI (3%))- (10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 12:1 a 17:1), Ejemplo 4; Trastuzumab-((EG2-MI (2%))- (10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 16:1 a aproximadamente 21:1), Ejemplo 7, Trastuzumab-((EG2-MI (2%))- (10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 5:1 a 10:1), Ejemplo 17; y Trastuzumab-((EG2-MI (2%))- (10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 19:1 a 24:1), Ejemplo 18A; (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 20:1 a 25:1), Ejemplo 18B; (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 23:1 a 28:1), Ejemplo 18C; PBRM en conjugado de PBRM-polímero-fármaco (es decir, Kadcyra®) y PBRM (es decir, trastuzumab) sola se determinaron utilizando procedimientos estándar BIAcore.

Usando la química de acoplamiento de aminos estándar, hErbB2 se inmovilizó en tres canales de flujo a la superficie de la superficie del chip sensor de resonancia de Plasmon en tres densidades similares. El trastuzumab se une fácilmente al hErbB2 inmovilizado, lo que demuestra que ambos miembros de la unión estaban activos. La Tabla VI proporciona los parámetros de unión k_a (constante de tasa de asociación o afinidad), k_d (constante de tasa de disociación) y K_D (constante de tasa de disociación) medida a 25 °C para los conjugados del Ejemplo 4 y el Ejemplo 7 y trastuzumab utilizando un biosensor óptico BioRad ProteOn XPR36 equipado con un chip sensor GLC y equilibrado con regulador de ejecución.

Tabla VI

	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
Trastuzumab	$9.90 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.60 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	26.2 ± 0.1
Kadcyra®	$4.61 \pm 0.2 \times 10^5$	$3.17 \pm 0.9 \times 10^{-5}$	68.7 ± 0.3
Ejemplo 4	$4.61 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.60 \pm 0.9 \times 10^{-5}$	56.3 ± 0.3

	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
Ejemplo 7	$5.3 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.43 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	45.9 ± 0.3
Ejemplo 14	$3.91 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.56 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	65.5 ± 0.5
Ejemplo 17	$8.30 \pm 0.2 \times 10^5$	$2.32 \pm 0.2 \times 10^{-5}$	28.0 ± 0.1
Ejemplo 18A	$4.67 \pm 0.7 \times 10^5$	$2.07 \pm 0.2 \times 10^{-5}$	44.4 ± 0.6
Ejemplo 18B	$3.05 \pm 0.2 \times 10^5$	$2.46 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	80.7 ± 0.6
Ejemplo 18C	$4.25 \pm 0.5 \times 10^5$	$2.03 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	47.7 ± 0.5

Los resultados muestran que la PBRM en el conjugado de PBRM-polímero-fármaco fue reconocido por el receptor de PBRM.

Ejemplo 50. Estudios de eficacia, farmacocinética y biodistribución in vivo.

- 5 Con el fin de evaluar la eficacia y la farmacocinética del conjugado proteína fármaco se utilizan se utilizan modelos de xenoinjerto subcutáneo y ortotópico de ratón y rata.

Los artículos de prueba, junto con los controles apropiados, se administran por vía intravenosa (IV) mediante inyección en la vena de la cola o por vía intraperitoneal. Para evaluar los niveles circulantes de la muestra de sangre del artículo de prueba, se recolecta en los momentos designados mediante una punción cardíaca terminal. Las muestras se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos para coagularse, luego se centrifugan durante 10 minutos a 1,000 x g a 4 °C y se congelan inmediatamente a -80 °C. Las concentraciones de PBRM totales en muestras de suero se miden utilizando ELISA. La concentración de fármaco circulante (conjugada y libre) se determina por métodos LC/MS/MS.

15 Para evaluar la eficacia de los conjugados de PBRM-polímero-fármaco, el tamaño del tumor se mide utilizando calibradores digitales. El volumen del tumor se calcula y se usa para determinar el retraso en el crecimiento del tumor.

Para la determinación de la biodistribución del fármaco, el tumor y los órganos principales tales como, por ejemplo, hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón, músculos y cerebro se recolectan, se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C. Los niveles de PBRM y/o fármaco se determinan en homogeneizados de tejidos mediante métodos estándar, tales como, por ejemplo, métodos ELISA o LC/MS/MS respectivamente.

- 20 Ejemplo 51 Distribución de tejido de ratón después de la administración de conjugados de PBRM-polímero-fármaco

Se inocularon ratones CB-17 SCID hembras con tumores BT474 (n = 4 para cada grupo). El vehículo o conjugados de PBRM-polímero-fármaco: Trastuzumab -((EG2-MI (3%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%)), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 12:1 a aproximadamente 17:1), Ejemplo 4, a 5 mg/kg y Trastuzumab -((EG2-MI (1%))-(10 kDa PHF-GA (29%)-(AF-HPA-Ala (6%)), (AF-HPA: trastuzumab de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 23:1), Ejemplo 13, a 5 mg/kg se dosificaron IV como una dosis única el día 1.

25 A las 48 horas posteriores a la administración, los ratones se sacrificaron y la sangre se recogió mediante un terminal cardíaco. Los órganos: riñón izquierdo, hígado, pulmón, músculo esquelético, bazo y tumor se recolectaron, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis de AF-HPA y AF conjugados, libres.

- 30 Las Tablas VII, VIII y VIIIA dan la concentración del fármaco conjugado (AF-HPA conjugado, es decir, PBRM-PHF-AF-HPA); fármaco no conjugado (libre) (es decir, AF-HPA y AF); AF-HPA libre y AF libre en diferentes tejidos. Las concentraciones se informan como ng AF-HPA (y/o AF) equivalente/g de tejido como valor medio \pm desviación estándar.

ES 2 754 397 T3

Tabla VII

Concentración de AF-HPA conjugado		
Tejido	Ejemplo 4	Ejemplo 13
Tumor	476±52	371±16
Higado	200±57	100±17
Baso	127±97	77±18
Riñón	190±15	137±4
Músculo	39±22	16±86
Plasma	2218±182	1720±501

Tabla VIII

Concentraciones totales de AF-HPA no conjugado y AF		
Tejido	Ejemplo 4	Ejemplo 13
Tumor	93.6±25.5	82.9±23.9
Higado	11.0±2.3	3.4±1.1
Baso	9.9±2.2	6.6±1.3
Riñón	9.0±2.1	0.7±0.0
Músculo	0.2±0.0	ND
Plasma	0.4±0.02	0.3±0.02

Tabla VIIIA

Concentraciones de AF-HPA no conjugados y de AF no conjugados				
Tejido	Ejemplo 4		Ejemplo 13	
	AF	AF-HPA	AF	AF-HPA
Tumor	67.3±17.5	21.6±6.8	56.3±16.2	22.3±6.8
Higado	8.4±1.5	2.0±0.7	5.0±1.3	1.6±1.2
Pulmón	2.4±0.7	1.2±0.1	1.5±0.4	0.9±0.2
Baso	7.9±1.9	1.4±0.2	5.5±1.0	0.9±0.1
Riñón	7.9±1.9	0.5±0.1	0.7±0.0	ND

Concentraciones de AF-HPA no conjugados y de AF no conjugados				
	Ejemplo 4		Ejemplo 13	
Tejido	AF	AF-HPA	AF	AF-HPA
Músculo	0.5±0.1	0.1±0.03	ND	ND
Plasma	ND	0.4±0.02	ND	0.3±0.02
ND = no determinado				

Los resultados muestran que en el tejido el AF-HPA no conjugado liberado se metaboliza aún más a la AF, mientras que en el plasma el AF-HPA no conjugado no se convierte a AF.

Ejemplo 52. Respuesta de crecimiento tumoral a la administración de conjugados de PBRM-polímero-fármaco

- 5 Se inocularon ratones CB-17 SCID hembra por vía subcutánea con tumores BT474 (n = 10 para cada grupo) o células JIMT-1 (n = 10 para cada grupo) o células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo). Se inocularon ratones hembra NCr nu/nu por vía subcutánea con células HL-60 (n = 10 para cada grupo). Los compuestos de prueba o el vehículo se dosificaron por vía intravenosa como una dosis única el día 1. El tamaño del tumor se midió en los tiempos indicados en las Figuras 1 a 9 utilizando calibradores digitales. Se calculó el volumen del tumor y se usó para determinar el retraso en el crecimiento del tumor. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1000 mm³. Los volúmenes de tumores se informan como la media ± SEM para cada grupo.

15 La Figura 1 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con tumores BT474 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; PBRM (trastuzumab) a 10 mg/kg; conjugado de PBRM-polímero-fármaco Trastuzumab -(EG2-MI (3%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%)), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 12 :1 a aproximadamente 17:1), Ejemplo 4, a 2.5 mg/kg y 5 mg/kg, o Trastuzumab-(EG2-MI (1%))-(10 kDa PHF-GA (29%)-(AF -HPA-Ala (6%)), (AF-HPA: trastuzumab de aproximadamente 18:1 a aproximadamente 23:1), Ejemplo 13, a 2.5 mg/kg y 5 mg/kg. Los resultados muestran una reducción del volumen del tumor para los Ejemplos 4 y 13 con 100% de regresiones a 5 mg/kg de dosis y 100% y 80% de supervivencia libre de tumor respectivamente. El vehículo y el trastuzumab solo mostraron un aumento del volumen del tumor. La conjugación de una PBRM específica para HER2 (trastuzumab) con un conjugado de fármaco polímero fue necesario para la reducción del volumen del tumor ya que la PBRM sola no mostró reducción en el volumen del tumor).

25 La Figura 2 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células JIMT-1 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV de vehículo; PBRM (trastuzumab) a 10 mg/kg; conjugados de PBRM-polímero-fármaco Trastuzumab-(EG2-MI (3%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (8%)), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 12:1 a aproximadamente 17:1), Ejemplo 4, a 2.5 mg/kg, o Trastuzumab-(EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9 %)), (AF-HPA: trastuzumab de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 21:1), Ejemplo 7, a 2.5 mg/kg. Los resultados muestran una reducción del volumen del tumor para los Ejemplos 4 y 7. Específicamente, en el grupo probado administrado con el conjugado descrito en el Ejemplo 4, hubo un 100% de regresiones a 2.5 dosis que consisten en nueve regresiones completas (un animal murió debido a una muerte no relacionada con el tratamiento) y tres sobrevivientes libres de tumor. En el grupo probado se administró con el conjugado descrito en el Ejemplo 7, hubo un 100% de regresiones, consistentes en regresiones completas, todas permanecieron libres de tumor (dos animales murieron libres de tumor al final del estudio debido a muerte no relacionada con el tratamiento). El vehículo, y el trastuzumab solo, mostraron un aumento del volumen tumoral. La conjugación de una PBRM específica para HER2 (trastuzumab) a un conjugado de fármaco polímero fue necesario para la reducción del volumen del tumor ya que la PBRM sola no mostró reducción en el volumen del tumor).

35 Se inocularon ratones hembra NCr nu/nu por vía subcutánea con células HL-60 (n = 10 para cada grupo). Los compuestos de prueba o el vehículo se dosificaron por vía intravenosa como una dosis única el día 1. El tamaño del tumor se midió en los tiempos indicados en la Figura 3 utilizando calibradores digitales. Se calculó el volumen del tumor y se usó para determinar el retraso en el crecimiento del tumor. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm³. Los volúmenes de tumores se informan como la media ± SEM para cada grupo.

45 La Figura 3 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células HL-60 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; PBRM (lintuzumab) a 20 mg/kg; o conjugados de PBRM-polímero-fármaco Lintuzumab-(EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (30%)-(AF-HPA-Ala (9%)), (AF-HPA: lintuzumab aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1), Ejemplo 8, 20 mg/kg. Los resultados muestran una reducción del volumen del tumor para el Ejemplo 8 con un 100% de regresiones

y un 70% de supervivencia libre de tumor en el día 44. El vehículo, y lintuzumab solo, mostraron un aumento del volumen del tumor. La conjugación de una PBRM específica para CD33 (lintuzumab) con un conjugado de fármaco polímero fue necesaria para la reducción del volumen del tumor ya que la PBRM sola no mostró reducción en el volumen del tumor.

5 La Figura 4 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células JIMT-1 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo; PBRM (trastuzumab) a 20 mg/kg; Kadcyla® (un conjugado de PBRM-fármaco) a 20 mg/kg; o conjugado de PBRM-polímero-fármaco Trastuzumab-((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1), Ejemplo 14, a 2 mg/kg, 0.67 mg/kg o 0.3 mg/kg. Los resultados muestran una reducción del volumen del tumor para el Ejemplo 14 con 100% de regresiones a dosis de 2.0 y 100% de supervivencia libre de tumor. El vehículo, Kadcyla® y trastuzumab solo mostraron un aumento del volumen del tumor. La conjugación de una PBRM específica para HER2 (trastuzumab) a un conjugado de polímero fármaco fue necesaria para la reducción del volumen del tumor ya que la PBRM sola no mostró reducción en el volumen del tumor.

15 La Figura 5 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo, o conjugado de PBRM-polímero-fármaco, Trastuzumab -((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA: trastuzumab de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 16:1), Ejemplo 15, a 3 mg/kg, 1 mg/kg o 0.3 mg/kg. Los resultados muestran una respuesta a la dosis para el conjugado de PBRM-polímero-fármaco (Ejemplo 15) con la dosis más alta de 3 mg/kg que muestra una regresión completa del volumen del tumor con 100 respuestas completas. En la dosis media de 1 mg/kg hubo 7 regresiones parciales y 1 completa de cada 10 animales.

20 La Figura 6 proporciona los resultados de la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración intravenosa como una dosis única en el día 1 del vehículo, conjugados de PBRM-polímero-fármaco, Trastuzumab-((EG2 -MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA: trastuzumab de aproximadamente 11:1 a aproximadamente 16:1), Ejemplo 14, a 0.67 mg/kg o Rituximab -((EG2-MI (2%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (9%))), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 13.7 a aproximadamente 18.7), Ejemplo 16, a 3 mg/kg. Los resultados muestran una respuesta de retraso de crecimiento tumoral para el conjugado de PBRM-polímero-fármaco (Ejemplo 14). El vehículo o conjugado de Rituximab-fármaco polímero (Ejemplo 16) a la dosis de 3 mg/kg no tiene efecto sobre el crecimiento del tumor.

25 La Figura 7 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración intravenosa como una dosis única en el día 1 del vehículo, conjugados de PBRM-polímero-fármaco, Trastuzumab -((EG2 -MI (2.7%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(t-butilglicina AF-HPA) (7.5%))), (AF-HPA: trastuzumab de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 6:1) Ejemplo 33, a 0.67 mg/kg; Trastuzumab-((EG2-MI (2.8%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (7.3%))) (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1), Ejemplo 43A a 1 mg/kg o Trastuzumab -((EG2-MI (2.5%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.4%))), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 12:1 a aproximadamente 16:1), Ejemplo 43C a 0.67 mg/kg o 3 mg/kg. Los resultados muestran una respuesta de retraso del crecimiento tumoral para el conjugado de PBRM-polímero-fármaco Ejemplo 43C a la dosis de 0.67 mg/kg y la dosis de 3 mg/kg mostraron una supervivencia libre de tumor del 90% en el día 115.

30 La Figura 8 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células NCI-N87 (n = 10 para cada grupo) después de la administración IV como una dosis única en el día 1 del vehículo, conjugado de polímero-fármaco 10K PHF-BA (30%)-AF-HPA-Ala (9.5%), Ejemplo 5A a 0.22 mg/kg; o conjugados de PBRM-polímero-fármaco Trastuzumab-((EG2-MI (2.7%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE) (9%))), (MMAE: trastuzumab aproximadamente 12:1 a aproximadamente 16.5:1) Ejemplo 30B, a 2 mg/kg; Rituximab -((EG2-MI (2.7%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(valina-aciloxiisopropiloxi-MMAE) (9%))) (MMAE: Rituximab aproximadamente 9.5:1 a aproximadamente 13:1), Ejemplo 30C a 2 mg/kg; sc-FvFc-Trastuzumab -((EG2-MI (2.8%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.1%))), (AF-HPA: scFvFc trastuzumab anticuerpo entre 14:1 a aproximadamente 19:1), Ejemplo 40 a 0.67 mg/kg; o Trastuzumab -((EG2-MI (2.5 %))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.4%))), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 12:1 a aproximadamente 17:1), Ejemplo 43B a 1 mg/kg; o dosificado semanalmente durante 3 semanas con Trastuzumab -((EG2-MI (2.65%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520 (2.9%))), (Arry 520: trastuzumab aproximadamente 4:1 a aproximadamente 6:1), Ejemplo 38 a 10 mg/kg, o dosificado semanalmente durante 3 semanas con Rituximab-((EG2-MI (2.65%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(Val-Cit-PABA-Arry 520 (2,9%))), (Arry 520: trastuzumab de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 6:1), Ejemplo 39 a 10 mg/kg; Los resultados muestran una respuesta de retraso del crecimiento tumoral para el conjugado de PBRM-polímero-fármaco (Ejemplo 40 y Ejemplo 43B).

35 La Figura 9 proporciona los resultados para la respuesta tumoral en ratones inoculados por vía subcutánea con células JIMT-1 (n = 10 para cada grupo) después de la administración intravenosa como una dosis única en el día 1 del vehículo, o sc-FvFc-Trastuzumab -((EG2- MI (2.8%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.1%))), (AF-HPA: anticuerpo scFvFc trastuzumab de aproximadamente 14:1 a aproximadamente 19:1), Ejemplo 40 a 1 mg/kg; o Trastuzumab-((EG2-MI (2.5%))-(10 kDa PHF-BA (28%)-(AF-HPA-Ala (8.4%))), (AF-HPA: trastuzumab aproximadamente 12 :1 a aproximadamente 16:1), Ejemplo 43C a 2 mg/kg.

Ejemplo 53. PK de plasma de ratón después de la administración de conjugados de PBRM-polímero-fármaco

Los ratones hembra CD-1 se dejaron aclimatar durante al menos 4 días antes de la dosificación inicial. A todos los ratones se les administró una comida regular y agua ad libitum y no se mantuvieron en ayunas antes de la administración del compuesto. Los compuestos de prueba o el vehículo se dosificaron IV como una dosis única el día 1.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con vehículo (n = 3) o con conjugado de PBRM-polímero-fármaco, Trastuzumab-((EG2-MI (3%))-(10 kDa PHF-BA (30%))-(AF-HPA Ala (8%))), (AF-HPA:trastuzumab aproximadamente 12:1 a aproximadamente 17:1), Ejemplo 4, a 5 mg/kg, n = 3 para cada grupo). El plasma se recogió a los 5 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, día 7 y día 14 después de la dosificación. El peso corporal se midió antes de la dosis el día 1 y en los días 1, 7 y 14. Todos los animales se observaron durante todo el período de catorce días para determinar la mortalidad o la morbilidad.

Las concentraciones de AF-HPA conjugado y de fármaco no conjugado (libre) (tal como AF-HPA y AF) se determinaron mediante análisis LC/MS. La concentración total de trastuzumab se determinó mediante ELISA.

Los resultados en la Figura 10 mostraron que el trastuzumab tenía una concentración plasmática de aproximadamente 100 µg/ml y una vida media de aproximadamente 12 días, mientras que el AF-HPA y la FA no conjugados tenían una concentración plasmática total de <1 ng/ml. El conjugado de PBRM-polímero-fármaco tuvo una vida media de > 5 días con un AUC^{0 a inf} de ~300 ug • día/ml.

Ejemplo 54. PK de plasma de ratón después de la administración de conjugados de PBRM-polímero-fármaco

Los ratones hembra CD-1 se dejaron aclimatar durante al menos 4 días antes de la dosificación inicial. A todos los ratones se les administró una comida regular y agua ad libitum y no se mantuvieron en ayunas antes de la administración del compuesto. Los compuestos de prueba o el vehículo se dosificaron IV como una dosis única el día 1.

Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con vehículo (n = 3) o con conjugados de PBRM-polímero-fármaco, como se describe en los Ejemplos 4, 7, 18A, 18B y 18C. El plasma se recogió a los 5 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, día 7 y día 14 después de la dosificación. El peso corporal se midió antes de la dosis el día 1 y en los días 1, 7 y 14. Todos los animales se observaron durante todo el período de catorce días para determinar la mortalidad o la morbilidad.

Las concentraciones totales de AF-HPA (AF-HPA conjugado y de fármaco no conjugado (libre) (tal como AF-HPA y AF) se determinaron mediante análisis de LC-MS/MS.

Tabla IX

PK de Plasma			
Muestra de prueba	Relación de AF-HPA a trastuzumab	T _{1/2} (hr)	AUC _{0 a 336} (µg•hr/mL)
Ejemplo 4	aproximadamente 12:1 a aproximadamente 17:1	125	20.1
Ejemplo 7	aproximadamente 16:1 a aproximadamente 21:1	136	22.9
Ejemplo 18A	aproximadamente 19:1 a aproximadamente 24:1.	154	19.4
Ejemplo 18B	aproximadamente 20:1 a aproximadamente 25:1.	139	22.7
Ejemplo 18C	aproximadamente 23:1 a aproximadamente 28:1	119	25.1

Los resultados en la Tabla IX mostraron que los conjugados de PBRM-polímero-fármaco tenían una vida media de ~120 - 154 horas (~5 - 6.4 días) con un AUC_{0 a 336} de ~19 a 25 µg • hr/mL y fueron independientes de la relación de AF-HPA a trastuzumab de los conjugados de PBRM-polímero-fármaco.

Ejemplo 55: Tolerabilidad del conjugado de PBRM-fármaco polímero (estudio MTD)

La tolerabilidad del conjugado de PBRM-polímero fármaco se estimó en ratones hembra CD-1. El conjugado de PBRM-polímero-fármaco, Ejemplo 4, se administró como una dosis intravenosa única en una dosis de 20 mg/kg, 40 mg/kg, 60 mg/kg (n = 6 para cada grupo). El grupo de control del vehículo recibió solución salina fisiológica. Los animales

fueron monitorizados para detectar signos clínicos durante un período de veintiún días. Los pesos corporales individuales de todos los animales del estudio se registraron en el día cero (línea de base), todos los días durante los primeros cinco días y aproximadamente cada dos días a partir de entonces. Los resultados se resumen en la Tabla X.

Tabla X

Grupo	Dosis (mg/kg)	% de cambio vs. su propia línea de base en el día 7	% de cambio vs. su propia línea de base en el día 21	Mortalidad o morbilidad
1	Vehículo	-1%	+ 7.3%	Ninguno
2	20	+ 3.7%	+ 14.8%	Ninguno
3	40	-20%	+ 10.8%	1 animal murió el día 7 a 12% de pérdida de peso corporal
4	60	-28%	NA	4 animales estaban moribundos y sacrificados el día 9

5

La dosis de 20 mg/kg fue bien tolerada, no se observó pérdida de peso corporal en ninguno de los ratones de este grupo. A la dosis de 40 mg/kg, la pérdida máxima de peso corporal del -20% se observó en rojo el día 7. Un animal de este grupo fue encontrado muerto el día 7 y tuvo una pérdida de peso corporal del 12% el día anterior. Al final del estudio (día 21), todos los animales supervivientes (5 de 6) en este grupo de estudio aumentaron de peso en relación con el grupo de control. La dosis de 60 mg/kg excedió claramente la dosis máxima tolerada, ya que todos los animales en este grupo tuvieron una pérdida de peso corporal significativa en el día 7 y estaban moribundos y se sacrificaron el día 9.

10

El resultado muestra que la dosis máxima tolerada para el ratón fue de entre 20 y 40 mg/kg.

Ejemplo 56: Tolerabilidad de la Auristatina F-hidroxiopropilamida (estudio MTD)

15 La tolerabilidad de la Auristatina F-hidroxiopropilamida (AF-HPA) se estimó en ratones hembra CD-1. La AF-HPA (preparada de una manera similar a la descrita en el documento US 13/493,899, ahora patente U.S. 8,685,383, ejemplo 48) se administró como una dosis intravenosa única en una dosis de 1.6 mg/kg, 3.2 mg/kg, 4.7 mg/kg (n = 6 para cada grupo). El grupo de control del vehículo recibió solución salina fisiológica. Los animales fueron monitorizados para detectar signos clínicos durante un período de veintiún días. Los pesos corporales individuales de todos los animales del estudio se registraron en el día cero (línea de base), todos los días durante los primeros cinco días y aproximadamente cada dos días a partir de entonces. Los resultados se resumen en la Tabla XI.

20

Tabla XI

Grupo	Dosis (mg/kg)	% de cambio vs. su propia línea de base en el día 7	% de cambio vs. su propia línea de base en el día 21	Mortalidad o morbilidad
1	Vehículo	-1%	+ 7.3%	Ninguno
2	1.6	11.6%	+5.5%	Ninguno
3	3.2	-20%	+ 10.8%	1 animal murió el día 7, 3 animales estaban moribundos y se sacrificaron el día 7. Dos sobrevivientes

Grupo	Dosis (mg/kg)	% de cambio vs. su propia línea de base en el día 7	% de cambio vs. su propia línea de base en el día 21	Mortalidad o morbilidad
4	4.7	-28%	NA	1 animal murió el Día 3, 1 estaba moribundo y se sacrificó el Día 3, 3 animales estaban moribundos y se sacrificaron el Día 4 y 1 animal el día 5. Sin sobrevivientes

La dosis de 1. mg/kg fue tolerada de forma aceptable, con un 11.6% de pérdida de peso corporal observada en el día 7. Los animales se recuperaron completamente el día 21 con un aumento de peso corporal del 5.5% en relación con su grupo de referencia. A la dosis de 3.2 mg/kg, 1 animal murió el día 7, 3 animales estaban moribundos y se sacrificaron el día 7. Al final del estudio (día 21), 2 de los 6 animales sobrevivieron. La dosis de 4.7 mg/kg excedió claramente la dosis máxima tolerada, ya que todos los animales en este grupo murieron o estaban moribundos y sacrificados.

Ejemplo 57. Estimación de la afinidad y cinética del conjugado de fármaco de polímero anti-5T4 scFvFc que se une al 5T4 humano (dominio extracelular) por resonancia de plasmón de superficie

Los parámetros de afinidad y cinética para la unión del conjugado de fármaco de polímero anti-5T4 scFvFc preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 10 al antígeno 5T4 se midieron mediante resonancia de plasmón de superficie utilizando un instrumento BIAcore T200 de GE Healthcare. El antígeno 5T4-ECD-Fc (dominio extracelular 5T4 humano fusionado con el dominio Fc del subtipo IgG1 humano) se inmovilizó covalentemente en un chip sensor BIAcore CM5 mediante un método de acoplamiento de amina utilizando reactivos proporcionados como un kit (GE Healthcare). En el estudio de unión, el conjugado anti-5T4 scFvFc polímero fármaco o proteínas de control se diluyeron en serie hasta una serie de concentraciones en el regulador de ejecución BIAcore HBS-EP + (solución salina regulada con HEPES suplementada con EDTA y P20) y se derramó sobre el antígeno inmovilizado durante un período fijo de tiempo para permitir la unión, seguido del flujo del regulador de ejecución solo para disociar el antígeno y, finalmente, la regeneración de la superficie utilizando una solución de bajo pH (10 mM de glicina-HCl, pH 2). Todos los reactivos BIAcore se obtuvieron de GE Healthcare. Las curvas de datos resultantes se denominan sensogramas y constituyen los datos de unión sin procesar. Los datos se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 utilizando el software BIAevaluation (GE Healthcare) y se estimaron los parámetros de afinidad/cinética tales como la tasa de asociación, la tasa de disociación y afinidad. Las estimaciones de afinidad son promedios de mediciones múltiples.

Como se ilustra en la Figura 11, el conjugado de fármaco de polímero anti-5T4 scFvFc (Ejemplo 10) se unió al dominio extracelular de 5T4 humano con alta afinidad (K_D de <30 pM). Este valor es similar al determinado para scFvFc anti-5T4 no conjugado.

Ejemplo 58. Unión del conjugado de fármaco de polímero scFvFc anti-5T4 al antígeno 5T4 de la superficie celular

Se evaluó la unión a la superficie celular del conjugado de fármaco de polímero scFvFc anti-5T4 (scADC anti-5T4) (Ejemplo 10) utilizando un citómetro de flujo de calibre FACS (Beckton Dickinson) en diversas líneas celulares de cáncer humano. La unión a la superficie celular del conjugado de fármaco de polímero scFvFc anti-5T4 se determinó mediante titulación y se comparó con la unión a la superficie celular medida para el anticuerpo scFvFc anti-5T4 no conjugado.

5T4 que sobreexpresa células MDA-MB-231 (MDA-MB-231-5T4 OE), MDA-MB-231 (negativo para 5T4; disponible en la American Type Culture Collection, Manassas Virginia, EE. UU., con el número de acceso HTB-26) y las células A431 (que expresan naturalmente 5T4) (A431, disponible en la American Type Culture Collection, Manassas Virginia EE. UU. con el número de acceso CRL-1555) recombinantes se utilizaron para la titulación del conjugado de fármaco de polímero scFvFc anti-5T4 y anti-5T4 scFvFc no conjugado. Las células en crecimiento exponencial se separaron del matraz de cultivo utilizando un regulador PBS/EDTA 0.5 mM. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con scFvFc anti-5T4, scADC anti-5T4 o proteína de fusión scFvFc sin unión (0.01 a 10 μ g/ml) en BSA-PBS al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con anticuerpo anti-Fc específico de FITC durante 45 minutos a 4 °C. Después de la incubación del anticuerpo FITC específico de anti-Fc, las células se lavaron tres veces con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Caliber, Becton Dickinson). Se determinaron las intensidades de fluorescencia mediana (MFI) para las muestras.

La unión a la superficie celular dependiente de la dosis específica para el conjugado de fármaco de polímero scFvFc anti-5T4 (Ejemplo 10) fue comparable a la de scFvFc anti-5T4 no conjugado en células tanto MDA-MB-231 sobreexpresadas con A431 como con 5T4. La unión de una proteína de fusión scFvFc no relacionada fue 200 veces

menor a 5 µg/ml. Además, las células MDA-MB-231, que son negativas para la expresión de 5T4, no mostraron ninguna unión de la superficie celular a scFvFc anti-5T4 o al ADC scFvFc anti-5T4 conjugado.

Ejemplo 59. Eficacia in vivo del conjugado de fármaco de polímero de scFvFc anti-5T4

5 Materiales: jeringas BD de 1 ml (calibre 271/2), medio de cultivo estéril, solución salina regulada con fosfato estéril, Matrigel - BD Biosciences (número de catálogo 354248), tapones de algodón estéril, tubos Eppendorf estériles (1,5 ml, 2 ml), pipetas, Papel de filtro, 70% alcohol/alcohol isopropílico, Vernier Caliper (Mitutoyo). Todos los demás elementos esenciales utilizados fueron de grado analítico.

10 Animales: ratones atímicos hembra lampiños (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}) de 5-6 semanas de edad, que pesaban 20-22 g se obtuvieron de Harlan, Países Bajos. Los animales fueron atendidos según el Reglamento del Comité para el propósito de control y supervisión de experimentos con animales (CPCSEA), el Gobierno de la India y la Asociación para la evaluación y acreditación del cumplimiento de los cuidados de animales de laboratorio (AAALAC). El Formulario B' para llevar a cabo la experimentación con animales fue revisado y aprobado por el Institutional Animal Ethics Committee.

15 Alojamiento y alimentación: Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado con una temperatura de 22 ± 3 °C, 50 ± 20% de humedad, un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno y 15-20 cambios de aire fresco por hora. Los animales se alojaron de forma grupal y se usó una mazorca de maíz sometida a autoclave como material de cama. Los animales fueron alimentados, ad libitum, con Dieta de Roedores de Laboratorio Irradiada certificada durante el período de estudio.

20 Preparación de los animales e identificación de los animales: Los animales se mantuvieron bajo aclimatación en la sala experimental durante un período de al menos 5 días. Los animales se numeraron individualmente y las tarjetas de la jaula que indicaban el experimento, el número de estudio, la fecha de implantación del tumor, la fecha de la aleatorización, el tipo de tumor, la cepa del ratón, el sexo y el número de ratón individual se mostraron en las jaulas correspondientes. Después de la asignación al azar, se agregaron la identidad del grupo, el compuesto de prueba, la dosis, el cronograma y la vía de administración.

25 Preparación de células tumorales: todos los procedimientos se realizaron en cabina de flujo laminar siguiendo técnicas estériles. Células cancerosas (a) A431 (Epidermoid), (b) MDA-MB-231 recombinante (mama) que sobreexpresa 5T4 (MDA-MB-231 5T4 ++), (5T4 OE), y (c) H1975 (carcinoma pulmonar de células no pequeñas) con 70-80% de confluencia y viabilidad de > 90% fueron escogidas para el estudio. Se resuspendieron 5 X 10⁶ células en 200 µl de PBS o medio libre de suero que contenía 50% de matrigel mantenido en hielo.

30 Inyección subcutánea de células: Se utilizaron ratones lampiños (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}) alojados en jaulas con ventilación individual (IVCs). Las líneas celulares de cáncer se propagaron en los animales mediante inyección subcutánea en los flancos o parte posterior de los animales. Se monitorizó el área implantada para el crecimiento del tumor. Una vez que los tumores fueron palpables y del volumen requerido (TV ≈ 150 mm³), los animales se asignaron al azar según el volumen del tumor y se inició la dosificación. El volumen del tumor se determinó mediante una medición bidimensional con un calibrador el día de la asignación aleatoria (Día 0) y luego una vez cada tres días (es decir, en los mismos días en que se pesaron los ratones). Usando un calibre de vernier, se midió la longitud (L) y el ancho (W) del tumor. El volumen del tumor (TV) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen del Tumor (mm}^3\text{)} = L \times W^2 / 2,$$

Donde, L = Longitud (mm); W = Ancho (mm).

40 El conjugado de fármaco de polímero de scFvFc anti-5T4 (Ejemplo 10) se disolvió en PBS 1x estéril, lo que dio como resultado soluciones claras en todas las concentraciones preparadas y se administró por vía intravenosa a través de la vena de la cola. El artículo de prueba estaba recién preparado los días de la administración y el volumen de la dosis se mantuvo en 5 ml/kg de peso corporal. Para cada grupo se utilizaron jeringas y agujas nuevas separadas.

45 Peso corporal: las observaciones laterales de la jaula, el peso corporal se midieron una vez cada tres días durante el período de estudio. Se calculó el % de cambio en el peso corporal de ratones individuales.

Actividad antitumoral: la actividad antitumoral se evaluó como la inhibición máxima del volumen del tumor versus al grupo de control del vehículo. La evaluación de los datos se realizó utilizando el software estadístico Graph pad versión.5.

50 Valor de prueba/control en % (% T/C): la inhibición del tumor en un día en particular (T/C en %) se calculó a partir de la relación de los valores medios de TV de los grupos de prueba versus control multiplicados por el 100%, de la siguiente manera: T/C (día X) = (TV media del grupo de prueba en el día X - TV media del grupo de prueba en el día 0)/(TV media del grupo de control en el día X - TV media del grupo de control en el día 0) x 100%

El valor mínimo (u óptimo) de % T/C registrado para un grupo de prueba en particular durante un experimento representa la actividad antitumoral máxima para el tratamiento respectivo. TV = volumen del tumor (mm³)

Inhibición del crecimiento tumoral (TGI): la TGI se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$TGI = (1 - T/C) \times 100$$

- 5 Donde, T = (TV media del grupo de prueba en el día X - TV media del grupo de prueba en el día 0) y C = (TV media del grupo de control en el día X - TV media del grupo de control en el día 0)

Signos clínicos: Morbilidad y mortalidad: Los animales se observaron individualmente para detectar signos clínicos generales visibles una vez cada tres días durante el período de estudio. Todos los animales fueron revisados por morbilidad y mortalidad.

- 10 Análisis estadístico: para la evaluación de la significación estadística de la inhibición del tumor, se realizó un ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior Bonferroni utilizando GraphPad Prism v5. Los valores de p <0.05 indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Resultados:

A431- Actividad antitumoral del xenoinjerto subcutáneo:

- 15 En experimentos de xenoinjerto con la línea celular A431 ["Characterization of the A431 tumor xenograft as an in vivo model for testing epidermal growth factor-receptor antagonists", S. Robinson et al., *Int. J. Oncol.* 1992, 1(3):293-8], el scADC anti-5T4 preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 10 se administró IV a los ratones portadores de tumores en las siguientes dosis: 10 mg/kg, dosis única; 1 mg/kg, Q4D x 4; 3 mg/kg, Q4D x 4; y 6 mg/kg, Q4D x 4. "Q4D x 4" significa una dosis cada 4 días, para un total de 4 dosis. Un grupo separado de ratones portadores de tumores se administró con scFvFc anti-5T4 no conjugado (10 mg/kg IV, Q4D x 4). En este estudio, el tratamiento con scADC anti-5T4 demostró una fuerte actividad antitumoral contra los xenoinjertos de carcinoma A431 cuando se administró como una dosis única o dosis repetidas en los niveles de dosis mencionados anteriormente (Figura 12). El tratamiento con scADC anti-5T4 en una dosis única (10 mg/kg IV) dio como resultado un valor T/C óptimo de -4% en el día 24. El % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) para 10 mg/kg IV grupo de dosis única se encontró que era del 104% (día 24, p <0,001). Se encontró que el valor T/C óptimo en grupos de dosis repetidas (1 mg/kg, 3 mg/kg y 6 mg/kg IV, Q4D x 4) era -2%, -4% y -3% en el día 24, respectivamente. Además, se encontró que el % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) para los grupos de dosis repetidas (1 mg/kg, 3 mg/kg y 6 mg/kg IV, Q4D x 4) era del 102% (día 24, p <0,001), 104 % (Día 24, p <0,001) y 103% (Día 24, p <0,001), respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con scADC anti-5T4 de dosis única y dosis repetidas. La administración de scFvFc anti-5T4 no conjugado a la dosis de 10 mg/kg IV, Q4D x 4 no causó ningún % de reducción significativa en el volumen tumoral de los xenoinjertos A431. El valor % T/C del día 24 se encontró que era del 87%. La diferencia en el tamaño del tumor entre el grupo tratado con el vehículo y el grupo tratado con ScFvFc anti-5T4 no fue estadísticamente significativa y se encontró que el % de inhibición del crecimiento del tumor (TGI) a esta dosis era del 13% (día 24). Régimen posterior al tratamiento, se observaron animales en los grupos de prueba scADC anti-5T4 hasta el día 90, momento en el que se terminó el estudio. En el grupo de dosis repetidas de scADC anti-5T4 tratado a 6 mpk, i.v, Q4D x 4, hubo una pérdida de peso corporal grave relacionada con el tratamiento (7/10 animales) el día 24; los animales supervivientes en este grupo de dosis se observaron hasta el día 90. Se observó una regresión completa del crecimiento tumoral en todos los grupos tratados con scADC anti-5T4 y no hubo signos de recrecimiento tumoral hasta el final del período de estudio (incluidos 3/10 en el grupo de 6 mpk, iv, Q4D x 4 dosis).

- 40 MDA-MB-231 5T4 ++ - actividad antitumoral de xenoinjerto subcutáneo:

- En un experimento con los xenoinjertos de MDA-MB-231-5T4 OE, se administró scADC anti-5T4 preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 10 a los ratones portadores de tumores en las siguientes dosis: 10 mg/kg IV, dosis única; 1 mg/kg IV, Q4D x 4; 3 mg/kg IV, Q4D x 4; y 6 mg/kg IV, Q4D x 4. Se administró un grupo separado con scFvFc anti-5T4 no conjugado (10 mg/kg IV, Q4D x 4). En este estudio, el tratamiento con scADC anti-5T4 demostró una fuerte actividad antitumoral contra los xenoinjertos de OE MDA-MB-231-5T4 cuando se administró como una dosis única o dosis repetidas en los niveles de dosis mencionados anteriormente (Figura 13). El tratamiento con scADC anti-5T4 en dosis única (10 mg/kg IV) dio como resultado un valor T/C óptimo de -25% en el día 18. El % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) para 10 mg/kg de grupo de dosis única IV se encontró que era 125% (Día 18, p <0,001). Se encontró que el valor T/C óptimo en grupos de dosis repetidas (1 mg/kg, 3 mg/kg y 6 mg/kg IV, Q4D x 4) fue de -26%, -32% y -38% en el día 18, respectivamente. Además, se encontró que el % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) para grupos de dosis repetidas (1 mg/kg, 3 mg/kg y 6 mg/kg IV, Q4D x 4) era 126% (día 18, p <0,001), 132 % (Día 18, p <0,001) y 138% (Día 18, p <0,001) respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento anti-5T4 scADC de dosis única y dosis repetidas. La terapia con scFvFc anti-5T4 no conjugado a la dosis de 10 mg/kg IV, Q4D x 4 mostró una actividad antitumoral moderada contra los xenoinjertos de MDA-MB-231 5T4 OE. Se encontró que el valor de % T/C del día 18 era del 45% y la inhibición del crecimiento del tumor (TGI) a esta dosis era del 55% (día 18, p <0.001). Además, se encontró que el volumen tumoral medio en el día 66 para el grupo de control del vehículo era de 1763 mm³. En los grupos de dosis repetidas scADC anti-5T4 (1 mpk, 3 mpk, iv; Q4D x 4) y en el grupo de dosis única (10 mpk, iv), hubo una regresión completa del crecimiento tumoral desde el día

45 hasta el día 90, momento en el que el estudio fue terminado. No hubo signos de recrecimiento tumoral en los grupos tratados con scADC anti-5T4 mencionados hasta el final del período de estudio. Sin embargo, en el grupo de dosis repetidas de scADC anti-5T4 tratado a 6 mpk, iv, Q4D x 4, hubo una pérdida de peso corporal grave relacionada con el tratamiento y mortalidad (10/10) el día 21. Se encontró que el volumen medio del tumor para el grupo tratado con el anticuerpo scFvFc anti-5T4 no conjugado en el día 72 era 1502 mm³. Se encontró que el valor de % T/C del día 66 para este grupo tratado con anticuerpos era del 60% y la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) a esta dosis fue del 40% (día 66, p <0.001).

H1975- Actividad antitumoral del xenoinjerto subcutáneo:

En experimentos de xenoinjerto realizados de manera similar con la línea celular de carcinoma de pulmón H1975, se administró IV scADC anti-5T4 preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 10 a los ratones portadores de tumores (n = 5 ratones por grupo, volumen tumoral inicial ~150 mm³) en las siguientes dosis: 0.3 mg/kg, Q4D x 4; 1 mg/kg, Q4D x 4; y 3 mg/kg, Q4D x 4. Se administró un grupo separado con anticuerpo scFvFc anti-5T4 no conjugado a 3 mg/kg IV, Q4D x 4. Tratamiento con scADC anti-5T4 (0.3 y 1 mg/kg, iv; Q4D x 4) dando como resultado una remisión parcial (en el día 39) de los xenoinjertos de tumores H1975 cuando se administró como dosis repetidas a los niveles de dosis mencionados anteriormente. El tratamiento con scADC anti-5T4 a 3 mg/kg, i.v; Q4D x 4, dio como resultado la remisión completa (en el día 39) de los xenoinjertos de tumores H1975. El tratamiento con scADC anti-5T4 a 0.3, 1 y 3 mpk, i.v; Q4D x 4 dio como resultado un valor T/C óptimo de -0.7%, -4% y -5% en el día 39 respectivamente y se encontró que el % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) era del 101%, 104% y remisión completa (CR (Día 39, p <0.001). El tratamiento con anticuerpo scFvFc anti-5T4 no conjugado dio como resultado una actividad antitumoral deficiente con un valor de % T/C de 88% en el día 39, con un % de TGI del 12%. En el régimen posterior al tratamiento, los animales en los grupos de prueba se observaron hasta el día 81, momento en el que se terminó el estudio. En el día 60, el tratamiento con scADC anti-5T4 (0.3 mg/kg, iv; Q4D x 4) demostró una remisión completa (3/5) en ratones lampiños con xenoinjerto H1975, mientras que se observó un recrecimiento tumoral en 2 animales desde el Día 39 hasta el Día 60, momento en el que se sacrificaron los animales de este grupo. Sin embargo, en el día 81, el tratamiento con scADC anti-5T4 (1 y 3 mg/kg, i.v; Q4D x 4) dio como resultado una remisión completa (5/5; día 81) en ratones lampiños con xenoinjertos H1975.

NCI-N87- actividad antitumoral de xenoinjerto subcutáneo:

De manera similar a los estudios de xenoinjerto tumoral descritos anteriormente, los experimentos con xenoinjerto se realizaron con la línea celular NCI-N87 (carcinoma gástrico). scADC aAnti-5T4 preparado de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 10 se administró IV a los ratones SCID con tumor (n = 10 ratones por grupo, volumen tumoral inicial ~135 mm³) en las siguientes dosis: 3 mg/kg, dosis única; y 3 mg/kg, Q4D x 3. Se administró un grupo separado con anticuerpo scFvFc anti-5T4 no conjugado a 3 mg/kg IV, Q4D x 3. Se evaluó una muerte no relacionada con el tratamiento en el grupo de dosis única scADC anti-5T4 3 mg/kg, y los datos para este animal se excluyeron del análisis. En el día 19, los grupos de tratamiento con scADC anti-5T4 mostraron una inhibición del crecimiento tumoral de 92 y 87% a 3 mg/kg, dosis única; y 3 mg/kg, Q4D x 3, respectivamente. Ambos grupos de tratamiento con scADC anti-5T4 tuvieron un 100% de regresiones completas, que fueron duraderas hasta el final del estudio en el día 75. El tratamiento con anticuerpo scFvFc anti-5T4 no conjugado produjo una actividad antitumoral deficiente con un valor de inhibición del crecimiento tumoral del 14% en el día 19; todos los animales en este grupo de tratamiento alcanzaron un punto final de volumen tumoral de 800 mm³ en el día 56.

40

REIVINDICACIONES

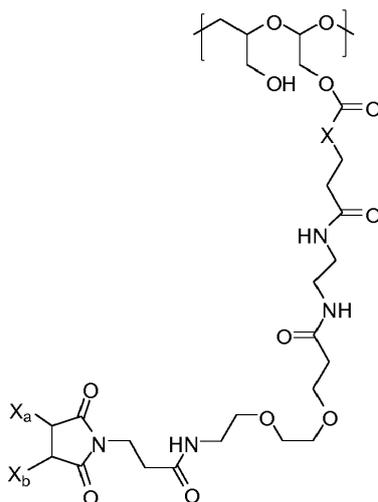
1. Un fármaco terapéutico y un conjugado de direccionamiento útil en terapias antineoplásicas que comprende:

5

(a) un ligando (LG) que comprende una inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma que se direcciona a la proteína oncofetal humana 5T4, uniéndose el ligando al mismo m_5 de armazones poliméricos de (b), en donde m_5 es de uno a diez;

(b) un armazón polimérico que comprende poli(1-hidroximetil-etileno-hidroximetil-etileno-formal) (PHF) que tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 40 kDa, en donde el armazón polimérico comprende unidades m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} monoméricas dispuestas al azar, definido como sigue:

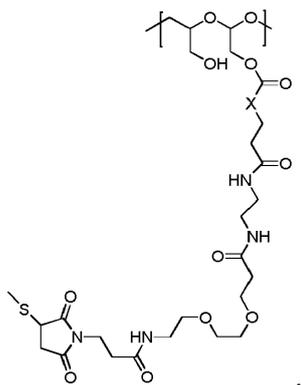
(i) m_{3a} :



10

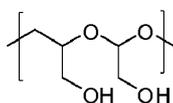
en donde m_{3a} está ausente o 1 a 17 unidades m_{3a} monoméricas están presentes en el armazón de polímero, y en cada unidad, X_a y X_b se seleccionan independientemente de (A) uno es H y el otro es una unidad estructural bloqueadora de maleimido, o (B) X_a y X_b , junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un doble enlace carbono-carbono;

15 (ii) m_{3b} ,



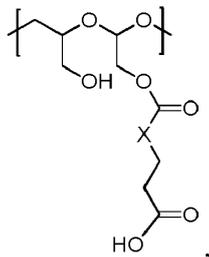
en donde el enlace sulfuro forma el punto de unión al ligando, y en donde están presentes de 1 a 8 unidades de monómero m_{3b} en el armazón polimérico, siempre que la suma de m_{3a} y m_{3b} sea de 1 a 18, y en donde el átomo de azufre sea parte del ligando

20 (iii) m :



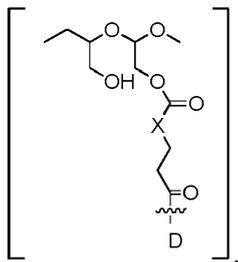
, en donde están presentes de 1 a 300 unidades m de monómero en el armazón polimérico;

(iv) m_1 :



en donde 1 a 140 unidades m_1 monoméricas están presentes en el armazón de polímero;

(v): m_2 :



5

en donde están presentes de 1 a 40 unidades m_2 monoméricas en el armazón de polímero; en donde en cada una de las unidades monoméricas m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} , X es CH_2 , O o NH ,

la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} , y m_{3b} varía de 15 a 300, y en donde

cada presencia de D independientemente es un agente terapéutico que tiene un peso molecular de

10 $\leq 5\text{kDa}$, y la



entre D y el grupo carbonilo denota la unión directa o indirecta de D al grupo carbonilo.

2. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 1, en donde el ligando tiene un peso molecular mayor de 40 kD y el PHF tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 40 kDa.

15 3. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 1, en donde el ligando comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.

20 4. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 3, en donde la inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, una inmunoadhesina, un $\text{F}(\text{Ab})_2$, un minicuerpo, Fab' , un anticuerpo de dominio único, un nanocuerpo, un Fv de cadena sencilla, un tándem / bis-scFv, un $\text{F}(\text{ab})_3$, un scFv-Fc (o scFvFc), un dsFv, un diacuerpo, un triacuerpo y un tetracuerpo.

5. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 4, en donde la inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma es un scFvFc anti-5T4 y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: E.

25 6. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 1, en donde D se selecciona independientemente del grupo que consiste en (a) una auristatina y sus análogos; (b) una caliqueamicina y sus derivados; (c) duocarmicina y sus análogos; (d) SN38, y (e) pirrolobenzodiazepina y sus análogos.

7. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 6, en donde la auristatina o análogo de la misma se selecciona del grupo que consiste en auristatina, dolastatina, monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF), auristatina F fenilendiamina (AFP) y auristatina F hidroxipropilamida (AF HPA).

30 8. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 1, en donde X es NH .

9. El fármaco terapéutico y el conjugado de direccionamiento de la reivindicación 1, en donde el PHF tiene un peso molecular que varía de 3 kDa a 15 kDa; la suma de m , m_1 , m_2 , m_{3a} y m_{3b} es de 20 a 110; m_1 es de 2 a 50; m_2 es de 2 a 15; m_{3a} es de 0 a 7; m_{3b} es de 1 a 8; y m_5 es de 2 a 4, y en donde la suma de m_{3a} y m_{3b} es de 1 a 8.

ojo, laringe, boca, mesotelioma, piel, mieloma, oral, rectal, garganta, vejiga, mama, útero, ovario, próstata, pulmón, colon, páncreas, renal y gástrico.

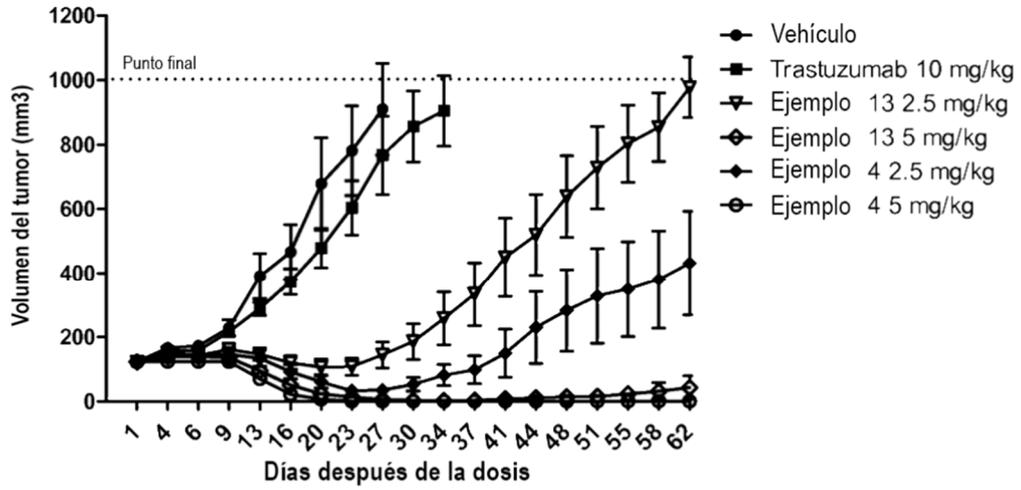


Figura 1

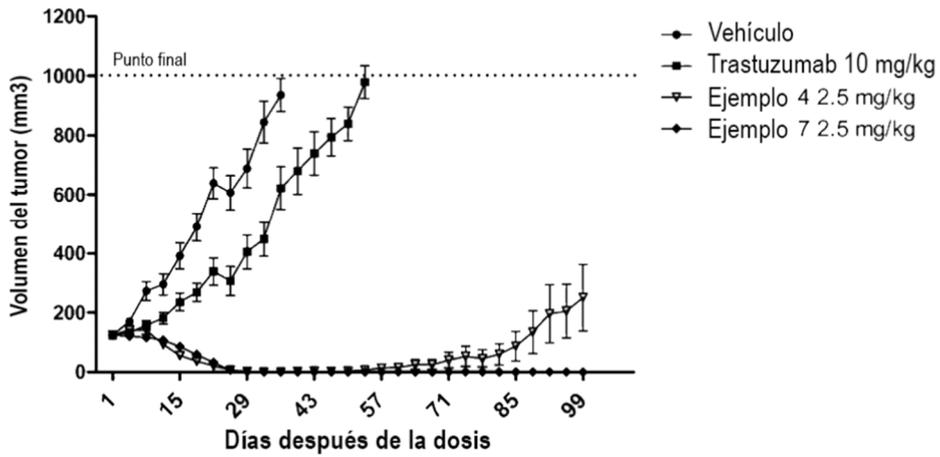


Figura 2

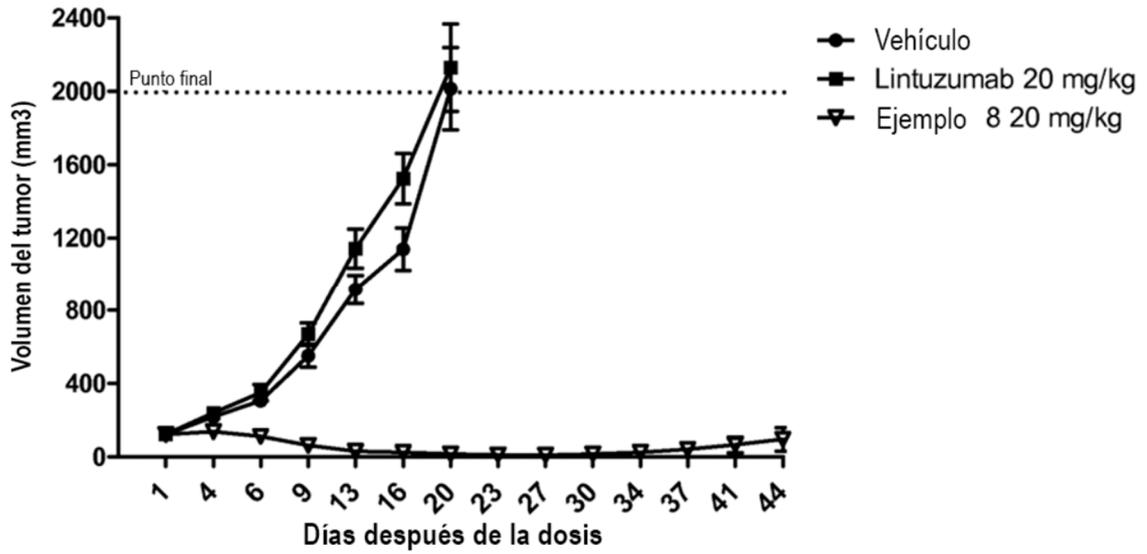


Figura 3

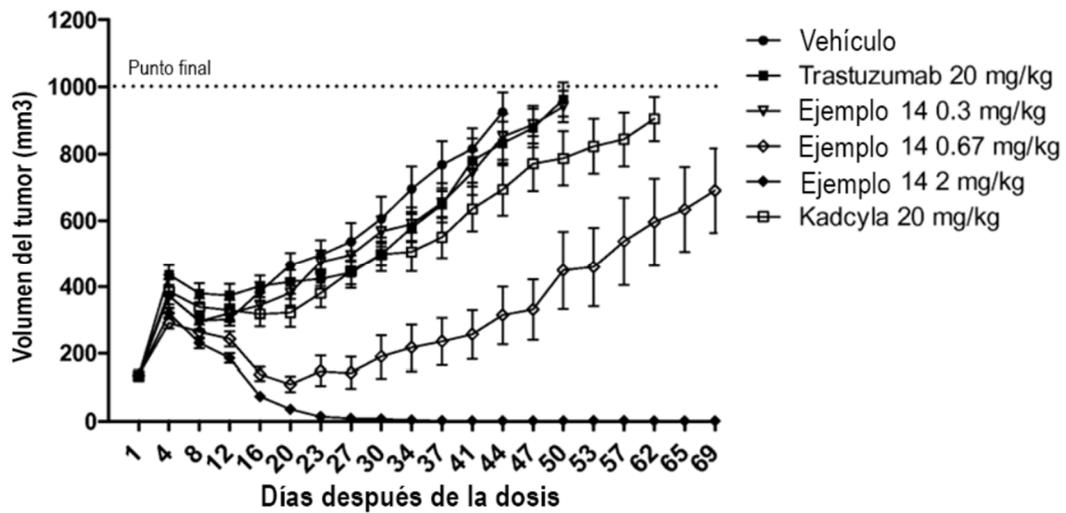


Figura 4

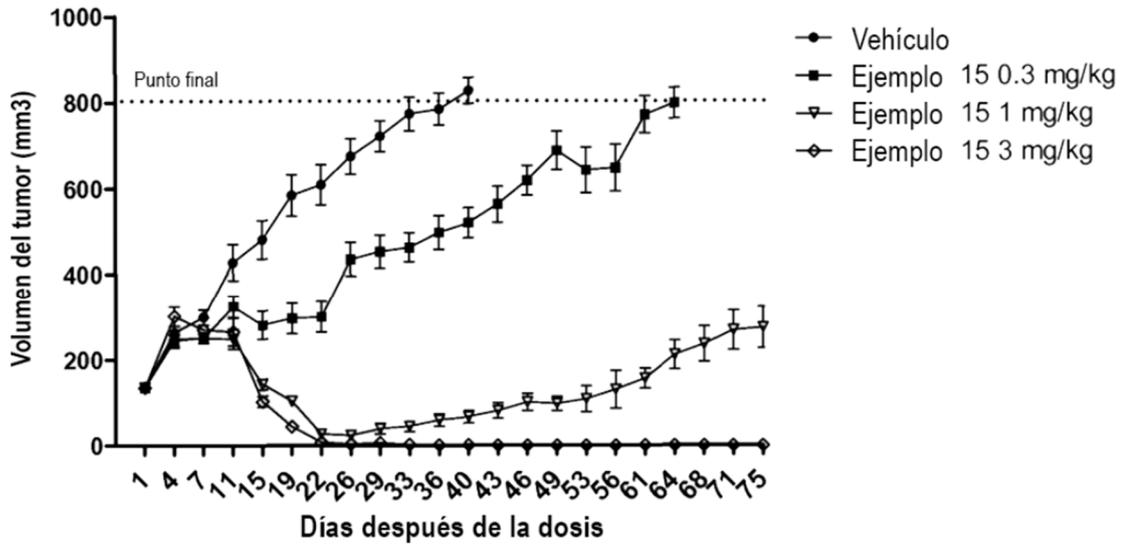


Figura 5

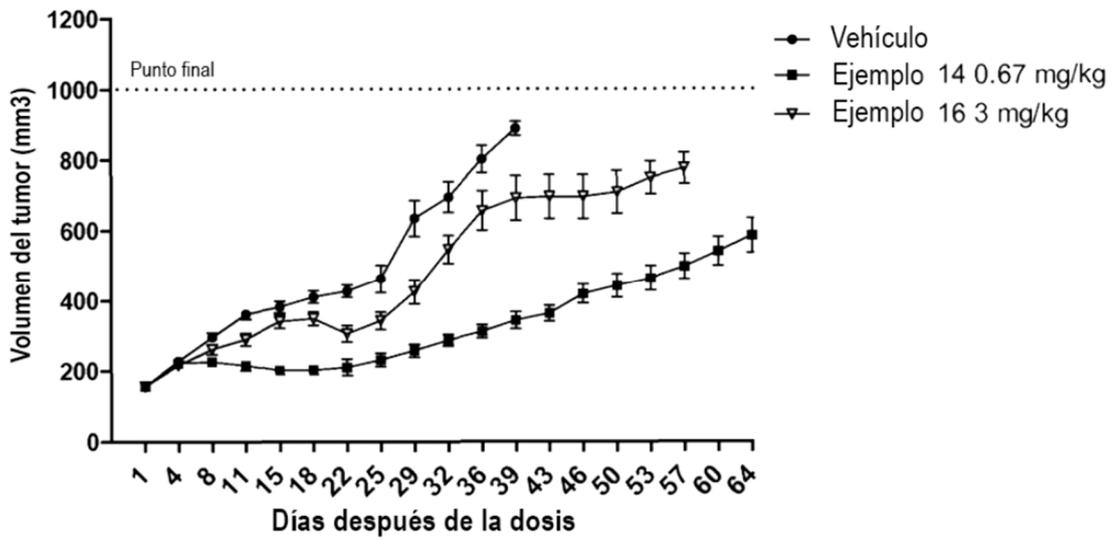


Figura 6

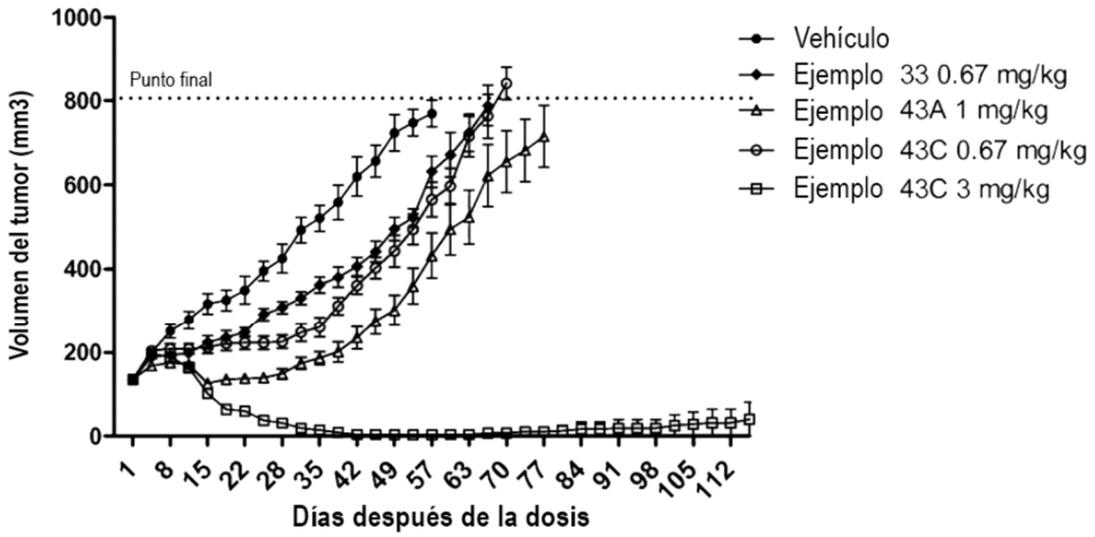


Figura 7

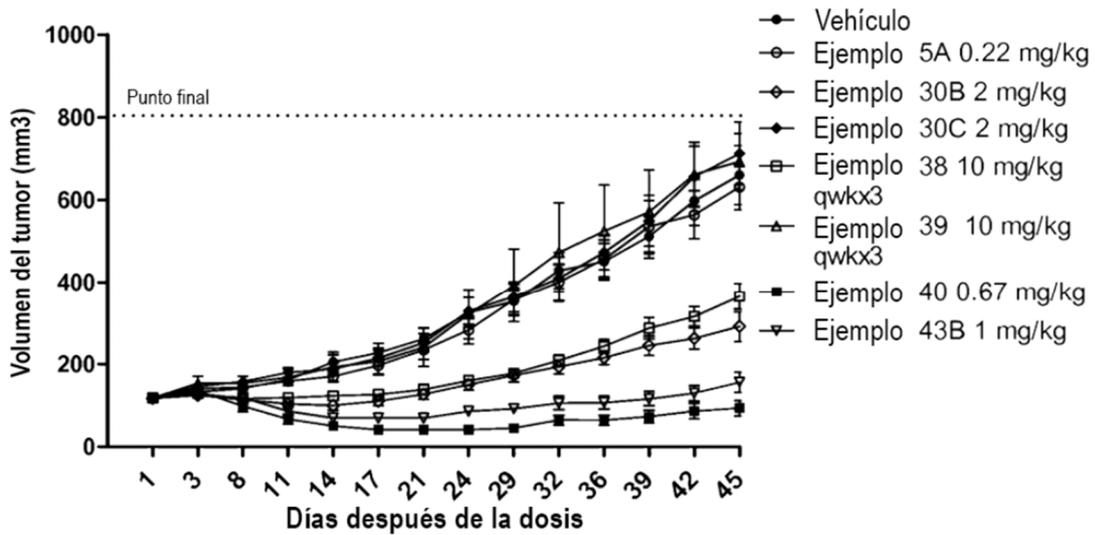


Figura 8

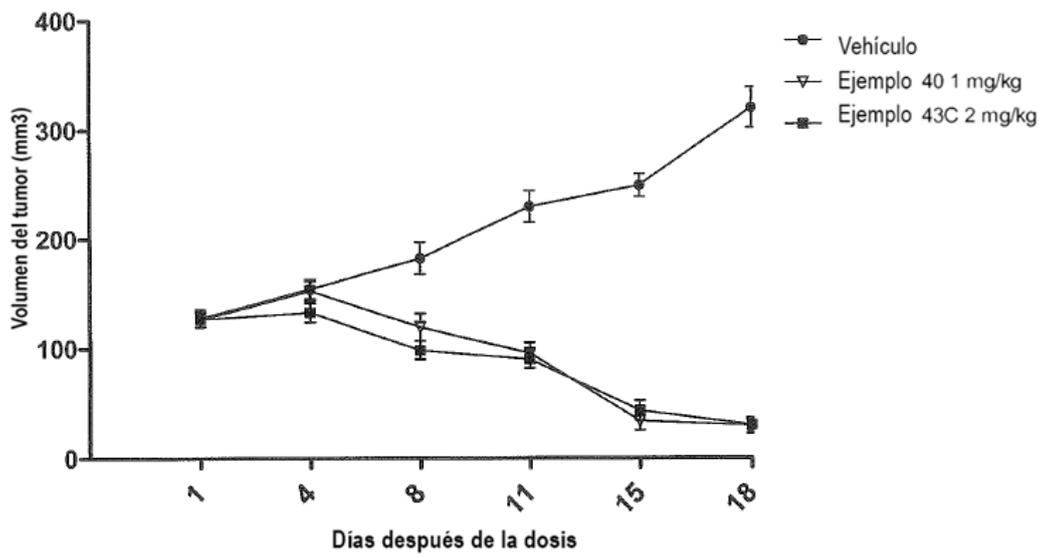


Figura 9

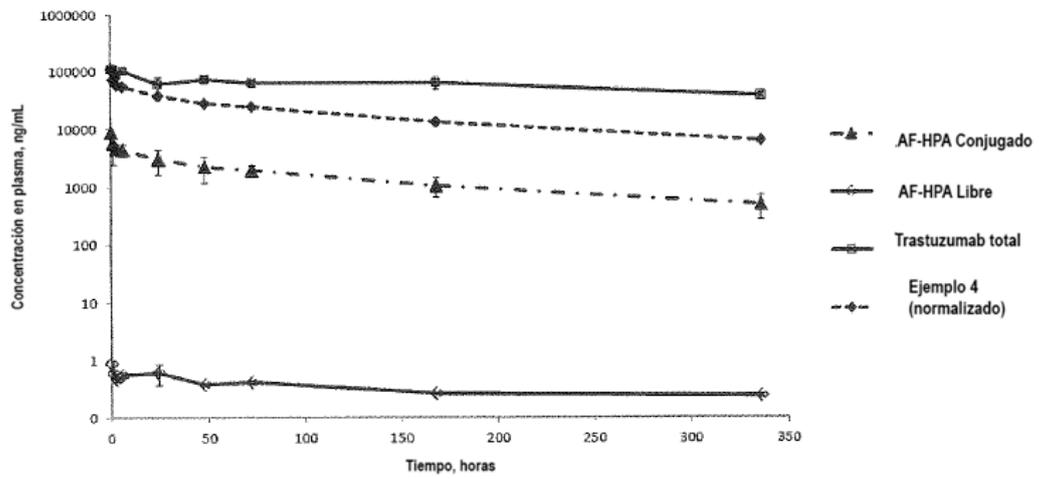
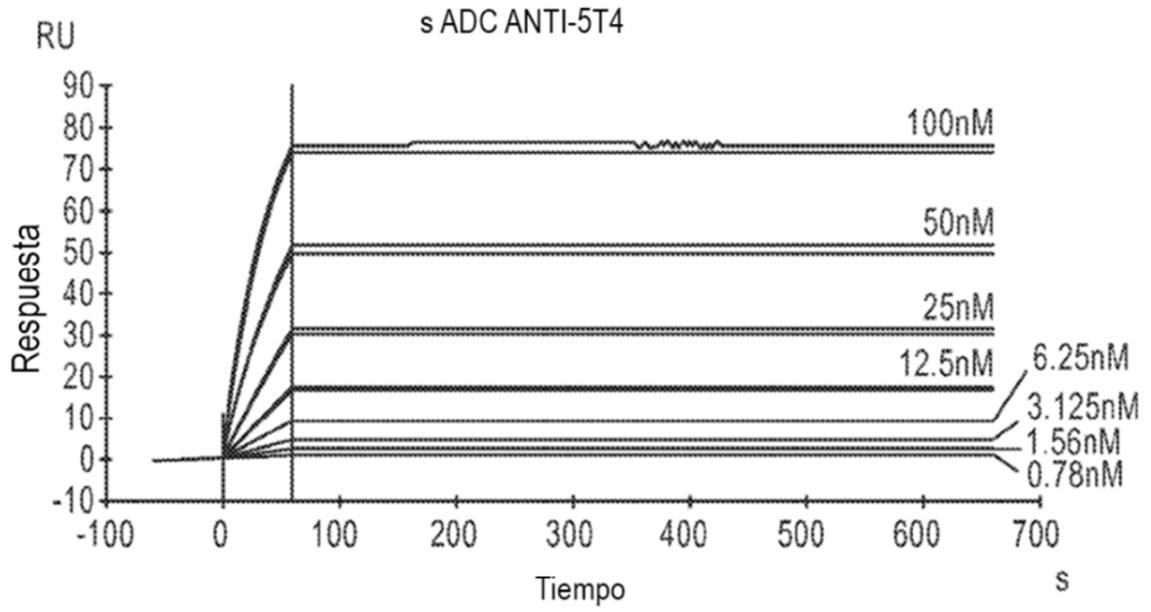


Figura 10



Parámetro	
Tasa de actividad (K activo)	$2.68 \cdot 10^5$
Tasa de inactividad (K inactivo)	$6.43 \cdot 10^{-7}$
Afinidad (KD)	< 30 pM

$$\chi^2 = 1.87$$

Figura 11

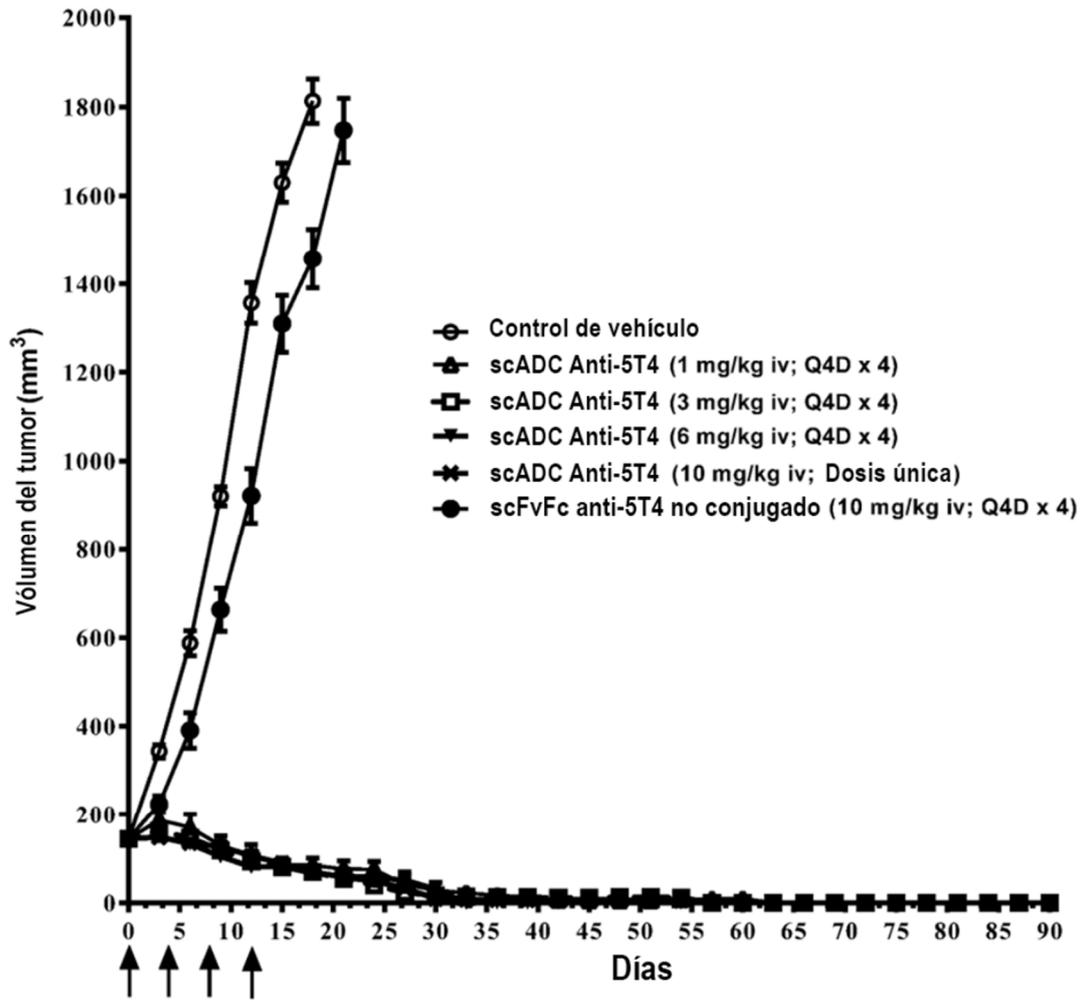


Figura 12

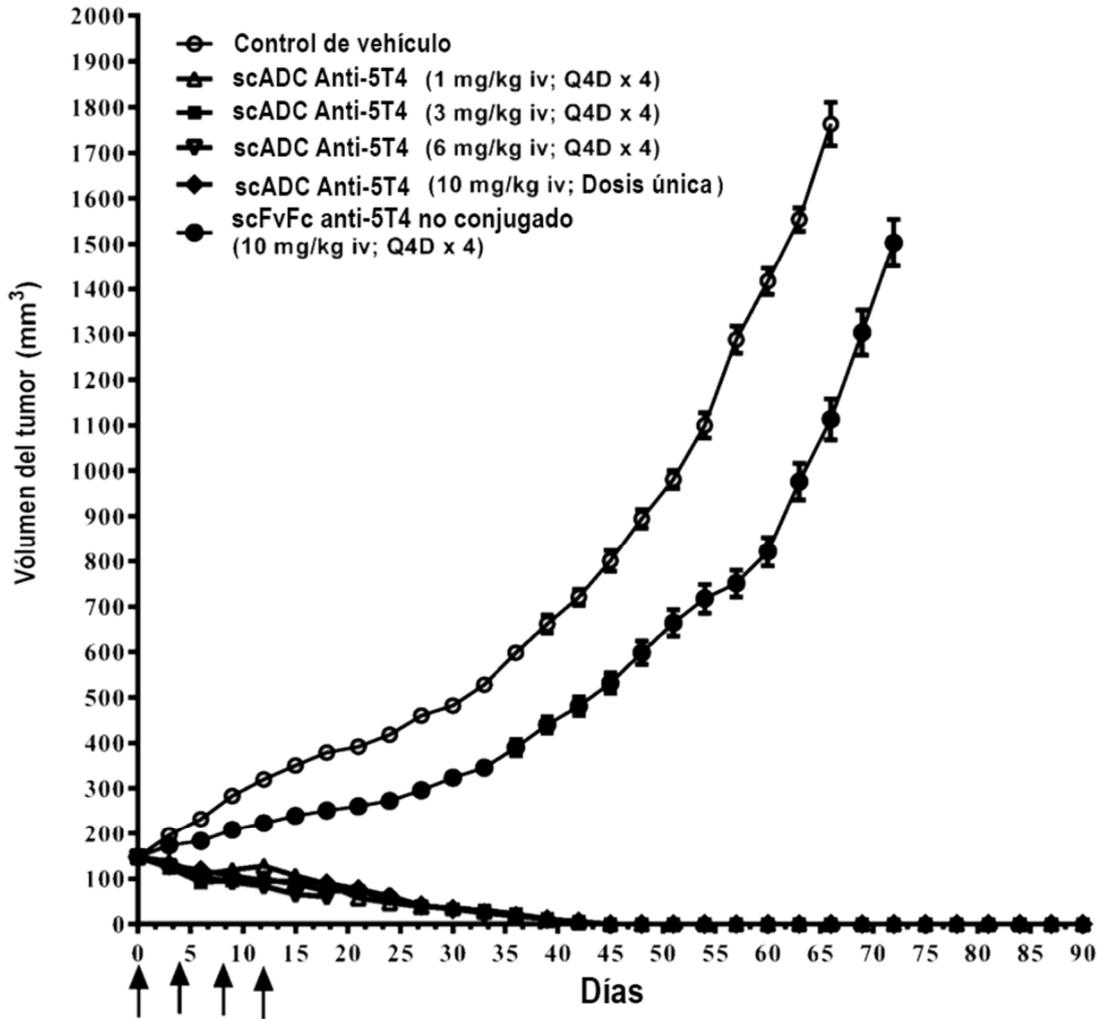


Figura 13