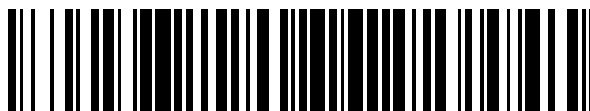


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 905**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/60** (2007.01) **C08G 65/329** (2006.01)

**A61K 31/4745** (2006.01) **C08G 65/333** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 47/10** (2007.01)

**A61K 47/20** (2006.01)

**C07D 457/00** (2006.01)

**C08G 83/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07D 491/22** (2006.01)

**C07D 519/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2014 PCT/US2014/059146**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15051307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2014 E 14796322 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3052101**

54 Título: **Conjugados de liberación lenta de SN-38**

30 Prioridad:

**04.10.2013 US 201361887111 P**

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

**12.05.2020**

73 Titular/es:

**PROLYNX LLC (100.0%)  
455 Mission Bay Blvd. South, Suite 145  
San Francisco, CA 94158, US**

72 Inventor/es:

**ASHLEY, GARY y  
SCHNEIDER, ERIC L.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 759 905 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

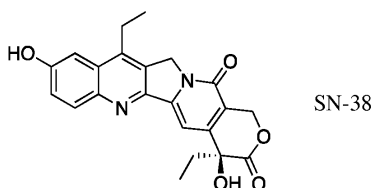
Conjugados de liberación lenta de SN-38

5 Campo técnico de la invención

La invención se refiere a sistemas de liberación lenta para un fármaco anticancerígeno, SN-38.

Estado de la técnica

10 El análogo de camptotecina SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina) es un metabolito activo del fármaco antitumoral irinotecano. Es ~1000 veces más activo que el irinotecano, pero no ha sido terapéuticamente útil debido a la solubilidad acuosa extremadamente pobre (17  $\mu\text{M}$ ) y a la rápida eliminación.



El propio irinotecano se usa clínicamente y ha mostrado actividad en leucemia, linfoma, cánceres colorrectal, pulmonar, de ovario, cervical, pancreático, de estómago y de mama. Varios estudios han indicado que las camptotecinas en general deben sus efectos antitumorales a la inhibición de la topoisomerasa I, y que la eficacia está relacionada con el mantenimiento de la inhibición de esta enzima durante periodos prolongados ("tiempo sobre el objetivo"). Para mantener niveles eficaces de camptotecinas durante un tiempo suficiente, normalmente se requiere que se administren dosis bastante altas de fármaco para contrarrestar la tasa de eliminación relativamente rápida del fármaco del sistema. Esto da como resultado altas concentraciones máximas de fármaco ( $C_{\text{máx}}$ ) en los primeros momentos después de la administración, lo que se cree que produce toxicidades tales como la diarrea potencialmente mortal que es la toxicidad limitante de la dosis de irinotecano. Dada la alta potencia de SN-38, sería deseable proporcionar el fármaco como una infusión prolongada a una concentración en estado estacionario suficiente para la inhibición de la topoisomerasa I pero inferior a la concentración tóxica. Los ensayos clínicos que utilizan la infusión prolongada de irinotecano a través de bombas han corroborado esta hipótesis, sin embargo, esta no es una estrategia terapéutica factible para SN-38 debido a la escasa solubilidad en las formulaciones de dosificación.

El irinotecano se convierte en SN-38 por la carboxiesterasa hepática, y luego se metaboliza mediante UGT1A hepático a su 10-glucuronido, SN-38G. La glucuronidación facilita la excreción biliar y la glucuronidasa bacteriana intestinal causa la reconversión de SN-38G a SN-38. A menos que UGT1A intestinal vuelva a convertir el fármaco en SN-38G inerte, el SN-38 puede causar efectos tóxicos en el intestino. Por lo tanto, SN-38G puede actuar tanto como la fuente de SN-38 tóxica como una protección contra la diarrea severa causada por SN-38. En general, los altos niveles de SN-38 provocan un aumento de la glucuronidación a SN-38G, una mayor excreción de SN-38G en el intestino y una desglucuronidación bacteriana que produce toxicidad gastrointestinal.

La liberación lenta de SN-38 de un conjugado circulante soluble y de larga vida en lugar de un profármaco como irinotecano parece proporcionar una solución a estos problemas, y se han aplicado diversas estrategias de conjugación a SN-38. La conjugación con poli(etilenglicol)(PEG) a través de un éster de glicinato de oxígeno-20 (patente de Estados Unidos No. 8.299.089) proporciona un conjugado relativamente soluble en agua que libera SN-38 libre relativamente rápido ( $t_{1/2} = 12$  h) debido a la hidrólisis del éster. Se ha descrito otra química de unión de éster a un polímero de polioli con liberación rápida de SN-38 (publicación de la patente de Estados Unidos No. 2010/0305149 A1). La conjugación a un copolímero de bloques de poliglutamato-PEG a través de enlaces éster con oxígeno-10 proporciona un conjugado micelar que libera nuevamente SN-38 libre por hidrólisis de éster (publicación PCT WO2004/039869). Debido a la inestabilidad de los ésteres en medios acuosos, posiblemente acelerada por esterases en plasma, tales estrategias de conjugación basadas en éster para SN-38 no son apropiadas para soportar la exposición a SN-38 a bajas dosis a largo plazo y los niveles de SN-38 típicamente caen por debajo del nivel eficaz entre dosificaciones. Los conjugados se administran típicamente a altos niveles, produciendo altas concentraciones máximas de SN-38 y dando como resultado la formación de altos niveles de SN-38G.

Los conjugados de PEG-SN-38 que tienen velocidades de liberación más controladas se han divulgado en la publicación PCT WO2011/140393. Estos conjugados liberan SN-38 a través de un mecanismo de eliminación beta, con velocidades controlables en un amplio intervalo mediante la selección del enlazador apropiado. El acoplamiento de una macromolécula a este fármaco se realizó mediante un producto de condensación de azida con un alquino cíclico que dio como resultado un conjugado relativamente insoluble. El subgénero reivindicado en el presente documento tiene una solubilidad mejorada debido a la presencia de un enlace amida simple, y es estable *in vitro* en tampón a temperatura ambiente. Ahora se ha encontrado inesperadamente que a través de la selección apropiada de la velocidad de liberación, la formación *in vivo* de SN-38G puede reducirse mientras que simultáneamente se

proporciona una exposición a largo plazo al SN-38 activo. La presente invención proporciona conjugados que están diseñados para liberar SN-38 libre a través de un mecanismo de eliminación beta no enzimático a velocidades que permiten regímenes de exposición a dosis bajas a largo plazo para SN-38 y que reducen aún más la cantidad de SN-38G formado durante la administración.

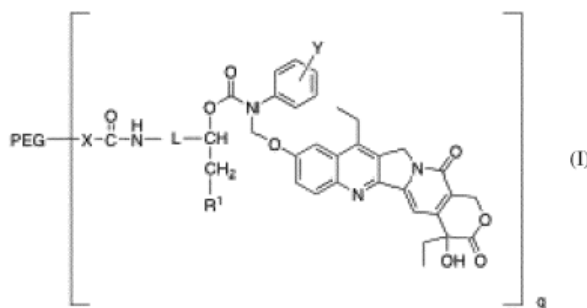
5 Divulgación de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

10 La presente invención proporciona conjugados que están diseñados para liberar SN-38 libre a través de un mecanismo de eliminación beta no enzimático a velocidades lentas que permiten regímenes de exposición a dosis bajas a largo plazo para SN-38 y que reducen aún más la cantidad de SN-38G formado durante la administración. También se proporcionan métodos para producir los conjugados y su uso en un método para el tratamiento de enfermedades y

15 afecciones caracterizadas por hiperproliferación celular.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona conjugados que tienen la fórmula (I)



20 en la que PEG es un polietilenglicol de peso molecular promedio entre 20.000 y 60.000 Da que es lineal o ramificado y cuando q es 2-8, de múltiples brazos;

q = 1-8;

X es O, NH, (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, OC(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, o NHC(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> en la que m = 1-6;

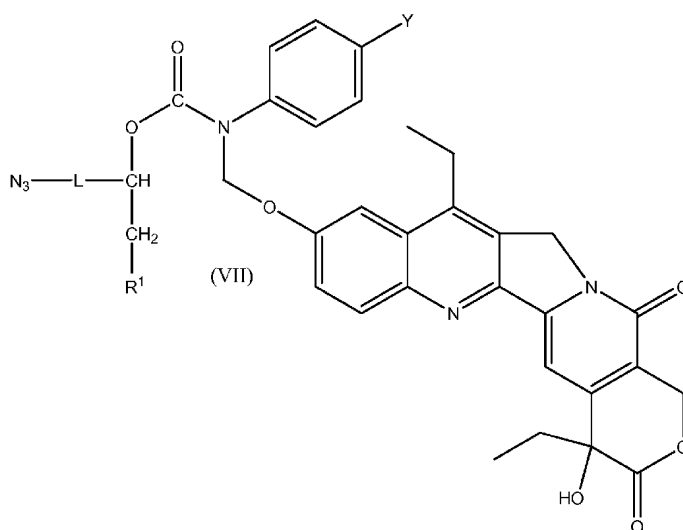
25 R<sup>1</sup> es CN o SO<sub>2</sub>NR<sup>2</sup><sub>2</sub> en la que cada R<sup>2</sup> es independientemente alquilo, arilo, heteroarilo, alquilalqueno, alquilarilo o alquilheteroarilo, cada uno opcionalmente sustituido o tomados juntos pueden formar un anillo;

Y = COR<sup>3</sup> o SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup> en la que R<sup>3</sup> = OH, alcoxi o NR<sup>4</sup><sub>2</sub>, en la que cada R<sup>4</sup> es independientemente alquilo, alquilo sustituido o tomados juntos pueden formar un anillo; y

L es (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> o (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, en la que r = 1-10 y p = 1-10.

30 En un segundo aspecto, la invención proporciona métodos para la preparación de conjugados de fórmula (I), así como productos intermedios de los mismos, que comprenden las etapas de:

35 (a) reducir un azida-enlazador-SN-38 de la siguiente fórmula (VII)



para producir un amino-enlazador-SN-38;

(b) poner en contacto el amino-enlazador-SN-38 con un PEG activado para producir un conjugado de fórmula 1; y  
 (c) opcionalmente aislar el conjugado.

Se describen además métodos para la liberación lenta de SN-38 usando conjugados de fórmula (I).

Además, se describen métodos para minimizar la cantidad de glucurónido de SN-38 formado tras la administración de SN-38 mediante el control de la velocidad de liberación de SN-38 de un conjugado.

Además, se describe una formulación que solubiliza SN-38 que comprende PEG y DMSO y su uso.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la liberación de SN-38 libre de los conjugados de la invención.

La Figura 2 ilustra un método para la preparación de productos intermedios azida-enlazador-SN-38 (VII) de la invención.

La Figura 3 ilustra un método para la reducción de azida-enlazador-SN-38 (VII) hasta amina-enlazador-SN-38 (VIII) usando trimetilfosfina y ácido acético en THF/agua.

La Figura 4 ilustra un método para la preparación de conjugados (I) de la invención, en el que R<sup>1</sup> es CN, Y es CONEt<sub>2</sub>, q = 4, X es CH<sub>2</sub>, L es (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> y PEG es un poli(etilenglicol) de 4 brazos que tiene un núcleo de pentaeritritol.

La Figura 5 muestra la estructura detallada de un conjugado de fórmula (I) en la que R<sup>1</sup> es CN, Y es CONEt<sub>2</sub>, q = 4, X es CH<sub>2</sub>, L es (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> y PEG es un poli(etilenglicol) de 4 brazos de peso molecular promedio 40.000 (n ~ 225).

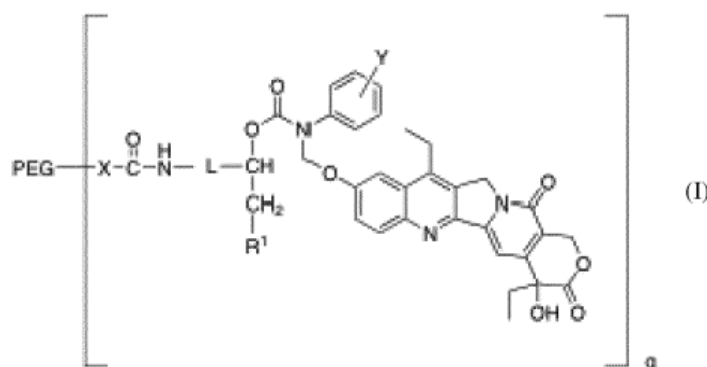
La Figura 6 muestra la cinética de liberación *in vitro* de SN-38 del conjugado de la invención en el que R<sup>1</sup> es CN, Y es CONEt<sub>2</sub>, q = 4, X es CH<sub>2</sub>, L es (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> y PEG es un poli(etilenglicol) de 4 brazos de peso molecular promedio 40.000. SN-38 tiene un pK<sub>a</sub> ~ 8,6 debido a la ionización del 10-OH; tras la formación del fenolato, la absorbancia máxima de UV/Vis de SN-38 cambia a 414 nm. Cuando se conjuga a través del 10-OH, SN-38 no muestra absorbancia a 414 nm. Por lo tanto, el aumento de la absorbancia a 414 nm es una medida de la formación de SN-38 libre a partir del conjugado. La curva indicada se ajustó a los datos experimentales utilizando una constante de velocidad de primer orden de 0,00257 min<sup>-1</sup> a pH 9,4. Esto se traduce en un t<sub>1/2</sub> para la liberación de 450 horas a pH 7,4.

La Figura 7 muestra niveles *in vivo* de conjugado (cuadrados) y SN-38 libre (círculos) liberados del conjugado de fórmula (I) en la que R<sup>1</sup> es CN, Y es CON(Et)<sub>2</sub>, q = 4, X es CH<sub>2</sub>, L es (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, y PEG es un poli(etilenglicol) de 4 brazos de peso molecular promedio 40.000, después de administración iv de 200 mg/kg de conjugado (7 mg/kg de SN-38) a ratas (promedio de n = 3). Las curvas se generaron como se describe en el Ejemplo 5 usando una liberación *in vivo* t<sub>1/2</sub> = 400 h.

La Figura 8 muestra los niveles *in vivo* de SN-38 libre (círculos) y glucurónido de SN-38 (cuadrados) formados a partir del conjugado de fórmula (I) en la que R<sup>1</sup> es CN, Y es CON(Et)<sub>2</sub>, q = 4, X es CH<sub>2</sub>, L es (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> y PEG es un poli(etilenglicol) de 4 brazos de peso molecular promedio de 40.000, después de administración iv de 200 mg/kg de conjugado (7 mg/kg de SN-38) a ratas (promedio de n = 3).

Modos de llevar a cabo la invención

En un aspecto, la invención proporciona conjugados que tienen la fórmula (I)



en la que el PEG es un polietilenglicol lineal o ramificado y, cuando q es 2-8, de múltiples brazos, de peso molecular promedio entre 20.000 y 60.000 Da;  
 q = 1-8;

X es O, NH, (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, OC(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, o NHC(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> en las que m = 1-6;

R<sup>1</sup> es CN o SO<sub>2</sub>NR<sup>2</sup><sub>2</sub> en la que cada R<sup>2</sup> es independientemente alquilo, arilo, heteroarilo, alquilalqueno, alquilarilo o alquilheteroarilo, cada uno opcionalmente sustituido o tomados en conjunto pueden formar un anillo;

Y = COR<sup>3</sup> o SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup> y R<sup>3</sup> = OH, alcoxi o NR<sup>4</sup><sub>2</sub>, en la que cada R<sup>4</sup> es independientemente alquilo, alquilo sustituido, o tomados juntos pueden formar un anillo; y

L es (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> o (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, en las que r = 1-10 y p = 1-10.

El término "alquilo" se define como un grupo hidrocarbonado saturado lineal, ramificado o cíclico de 1-8 carbonos, o en algunas realizaciones 1-6 o 1-4 átomos de carbono.

5 El término "alquenilo" se define como un hidrocarburo insaturado lineal, ramificado o cíclico no aromático de 1-6 o 1-4 C con uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

El término "alquinilo" se define como un hidrocarburo insaturado lineal, ramificado o cíclico no aromático de 1-6 o 1-4 C con uno o más triples enlaces carbono-carbono.

10 El término "alcoxi" se define como un grupo alquilo unido al oxígeno, que incluye metoxi, etoxi, isopropoxi, ciclopropoxi, ciclobutoxi y similares.

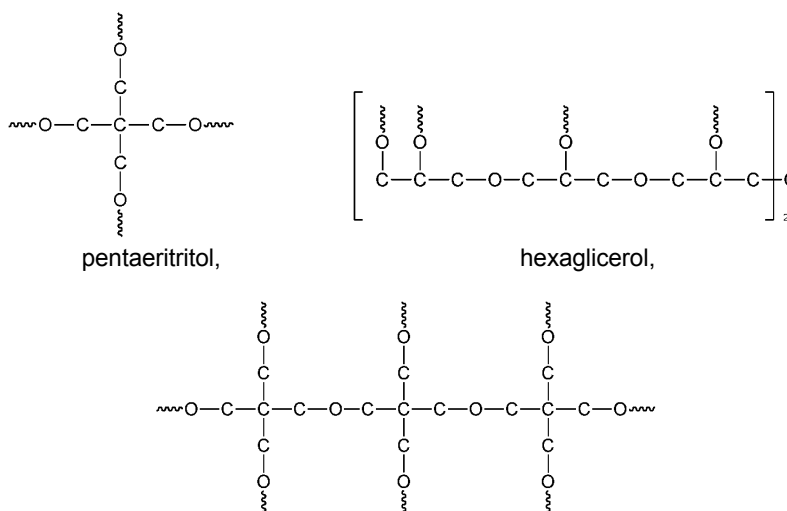
15 El término "arilo" se define como un grupo hidrocarbonado aromático de 6-18 carbonos, preferiblemente 6-10 carbonos, que incluye grupos tales como fenilo, naftilo y antraceno. El término "heteroarilo" se define como anillos aromáticos que comprenden 3-15 carbonos que contienen al menos un átomo de N, O o S, preferiblemente 3-7 carbonos que contienen al menos un átomo de N, O o S, incluidos grupos tales como pirrolilo, piridilo, pirimidinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, quinolilo, indolilo, indenilo y similares.

20 El término "halógeno" incluye bromo, flúor, cloro y yodo.

25 Cuando los grupos están "opcionalmente sustituidos", los sustituyentes incluyen 1-3 sustituyentes que son iguales o diferentes y pueden incluir halógeno, amino, hidroxilo y sulfhidrilo, así como sustituyentes que contienen grupos carboxilo como ésteres, amidas o como grupos carboxilo libres. Esta lista no pretende ser exhaustiva, y cualquier sustituyente que no interfiera puede incluirse entre los que están opcionalmente presentes.

Como se usa en el presente documento, "un", "uno, una", etc., pretenden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario. Además, cuando se proporcionan intervalos de números enteros, se entiende que todos los números enteros intermedios están incluidos como si se los mencionara específicamente.

30 El PEG puede ser un poli(etilenglicol) lineal, ramificado o de múltiples brazos de peso molecular promedio entre 20.000 y 60.000 (es decir, que comprende de aproximadamente 400 a aproximadamente 1500 unidades de óxido de etileno) o 30.000-50.000, en el que al menos un extremo del polímero puede terminarse con una función carboxilato. Estos PEG están disponibles comercialmente, por ejemplo a través de NOF y Jenkem Technologies, como derivados en los que el grupo C=O se activa por reacción con aminas como N-hidroxisuccinimida o ésteres de nitrofenilo o carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo o nitrofenilo. Estos PEG de alto peso molecular están compuestos por una distribución gaussiana de pesos moleculares (es decir, son polidispersos) y, por lo tanto, comprenden una distribución del número de unidades de óxido de etileno; se describen por un peso molecular promedio que en este documento pretende abarcar la distribución de pesos moleculares y unidades de óxido de etileno comúnmente encontradas en materiales suministrados industrialmente que tienen el peso molecular promedio descrito. Los índices de polidispersidad (PDI) típicos para PEG de 4 brazos son menores o iguales a 1,1, y se calculan como  $PDI = M_w/M_m$ , en la que  $M_w$  = masa molar promedio en peso calculada como  $\sum M_i^2 N_i / \sum M_i N_i$  y  $M_m$  = masa molar promedio en número calculada como  $\sum M_i N_i / \sum N_i$ , en la que M es el peso molecular de la especie i y N es el número de especies i en la muestra. PDI puede medirse mediante técnicas conocidas en el arte, tales como cromatografía de permeación en gel, HPLC o espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación de la patente de Estados Unidos No. 2010/0126866 A1).  
 45 Los PEG de múltiples brazos pueden formarse a partir de una variedad de unidades centrales, que incluyen pentaeritritol, hexaglicerol y tripentaeritritol,

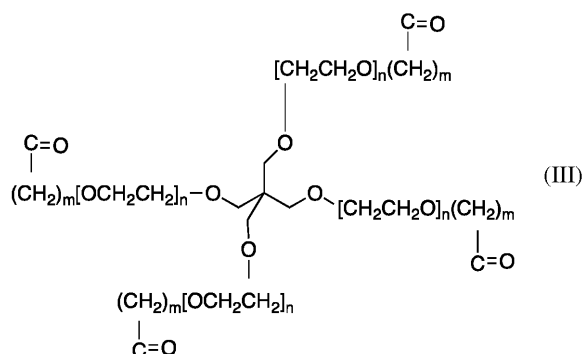


50

## tripentaeritritol

para proporcionar una variedad de configuraciones y número total de brazos. Al menos un brazo del PEG termina con una función carboxilato a través de la conexión del grupo X para permitir la unión del enlazador-SN-38. X sirve para unir la función carboxilato al PEG y, por lo tanto, puede ser cualquiera de los grupos conectores típicos, incluidos O, NH,  $(CH_2)_m$ ,  $OC(=O)(CH_2)_m$  o  $NHC(=O)(CH_2)_m$  en las que  $m = 1-6$ . En ciertas realizaciones de la invención, X es O, NH,  $(CH_2)_m$ , o  $NHC(=O)(CH_2)_m$ . En una realización de la invención, X es  $(CH_2)_m$ .

En ciertas realizaciones específicas de la invención, el PEG tiene un peso molecular promedio de  $40.000 \pm 4.000$  Da (es decir, que comprende de aproximadamente 800-1000 unidades totales de óxido de etileno). En una realización, el PEG es un polímero de 4 brazos que tiene un núcleo de pentaeritritol y un peso molecular promedio de  $40.000 \pm 4.000$  Da, en el que cada brazo comprende por lo tanto,  $225 \pm 25$  unidades de óxido de etileno en promedio y termina en un grupo carboxilato, y que tiene La fórmula (III).



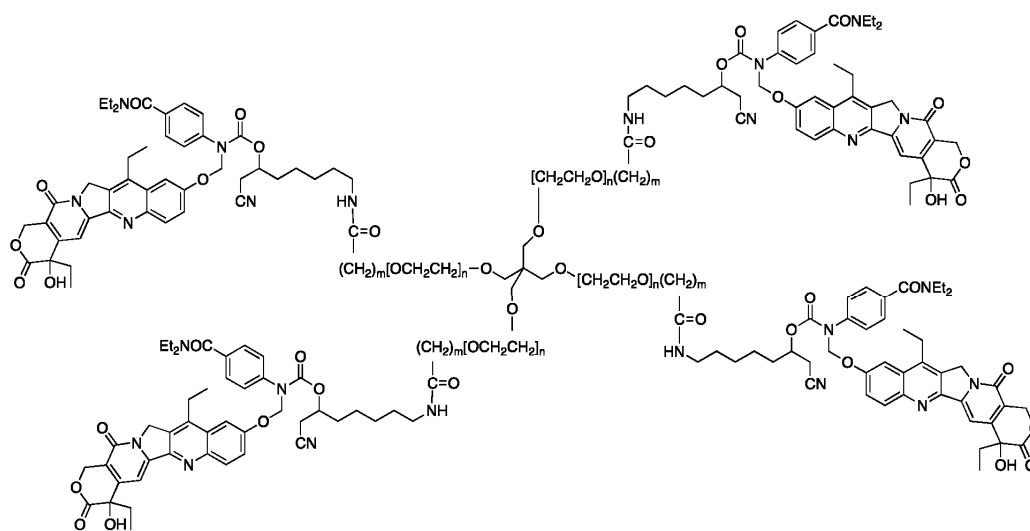
en la que  $n = 200-250$  y  $m = 1-6$ . Si bien los conjugados relacionados se han descrito previamente en la publicación PCT WO2011/140393, inesperadamente se ha encontrado que la conexión del PEG al enlazador-SN-38 a través de un enlace amida más hidrófilo proporciona conjugados con propiedades de solubilidad y viscosidad mejoradas sobre los conjugados descritos anteriormente en los que el PEG se conectó a través de una cicloadición 1,3-dipolar entre una azida y un dibenzoazaciclooctino (DBCO o DIBOC).

L es un grupo de conexión que tiene la fórmula  $(CH_2)_r$ , o  $(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_r$ , en la que  $r = 1-10$  y  $p = 1-10$ .

$R^1$  es CN o  $SO_2NR^2_2$ , en el que cada  $R^2$  es independientemente alquilo, arilo, heteroarilo, alquilalqueno, alquilarilo o alquilheteroarilo, cada uno opcionalmente sustituido o tomados en conjunto pueden formar un anillo. En algunas realizaciones, cada  $R^2$  es independientemente alquilo.  $R^1$  controla la velocidad de liberación de SN-38 del conjugado, como se describe en la publicación PCT WO2011/140393 y la solicitud PCT/US12/54293. Para soportar regímenes de exposición a dosis bajas a largo plazo, la tasa de liberación de SN-38 de los conjugados debe ser tal que la vida media *in vivo* de la liberación sea entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000 horas, preferiblemente entre aproximadamente 300 y aproximadamente 800 horas, y lo más preferiblemente aproximadamente de 400 a 500 horas. Se observa que las velocidades de liberación *in vivo* pueden ser hasta aproximadamente 3 veces más rápidas que las velocidades de liberación *in vitro* correspondientes medidas a pH 7,4, 37 °C. En ciertas realizaciones,  $R^1$  es CN. En esta realización, la vida media de liberación *in vitro* e *in vivo* (rata) se ha medido como 400 horas. En ciertas otras realizaciones,  $R^1$  es  $SO_2NR^2_2$ . En ciertas realizaciones específicas,  $R^1$  es  $SO_2NR^2_2$  en la que cada  $R^2$  es independientemente metilo, etilo, alilo, bencilo, 2-metoxietilo o 3-metoxipropilo, o  $NR^2_2$  forma morfolino, 2,3-dihidroindolilo o 1,2,3,4-tetrahidroquinolilo.

Y es un sustituyente que retira electrones que estabiliza el conjugado contra la liberación prematura. En ciertas realizaciones, Y es  $COR^3$  o  $SO_2R^3$ , en la que  $R^3 = OH$ ,  $OR^4$  o  $NR^4_2$ , en la que cada  $R^4$  es independientemente alquilo, alquilo sustituido o ambos  $R^4$  tomados juntos pueden formar un anillo. En algunas realizaciones, Y está en la posición para. Y sirve para estabilizar el enlace de N-CH<sub>2</sub>-O a SN-38, minimizando así la tasa de escisión espontánea del fármaco del conjugado. En ciertas realizaciones, Y es  $CONR^4_2$ , y en ciertas realizaciones específicas Y es  $CON(CH_2CH_3)_2$ ,  $CON(CH_2CH_2)_2O$  o  $SO_2N(CH_2CH_2)_2O$  en la que  $(CH_2CH_2)_2O$  combinada con N es morfolino. Los p-aminobenzoatos y las p-aminosulfonamidas resultantes de la eliminación beta y la liberación de SN-38 generalmente se consideran de baja toxicidad.

En una realización específica de la invención, se proporciona un conjugado de fórmula (I) que tiene la estructura (II)



(II)

5 en la que  $m = 1-6$  y  $n = 100-375$  (es decir, un PEG de peso molecular promedio entre 20.000y 60.000 Da, o 30.000-50.000 Da). En una realización más específica de la invención, se proporciona un conjugado que tiene la fórmula (II) en la que  $m = 1-3$ . En una realización aún más específica de la invención,  $m = 1$  y  $n = 200-250$  o  $\sim 225$  de modo que el peso molecular promedio de PEG es de aproximadamente 40.000.

10 En otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para la preparación de los conjugados de fórmula (I). En la Figura 2 se ilustra un método para la preparación del producto intermedio azida-enlazador-SN-38, previamente descrito en la publicación PCT WO2011/140393. Por lo tanto, un alcohol azida (IV) se convierte en carbamato (V), por ejemplo, mediante conversión del producto intermedio al cloroformiato utilizando fosgeno o un equivalente de fosgeno como el trifosgeno en presencia de una base suave como la piridina, seguido por reacción con la anilina  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-Y}$ . Alternativamente, (V) puede formarse directamente por tratamiento de (IV) con el isocianato  $\text{OCN-C}_6\text{H}_4\text{-Y}$ . El carbamato (V) se N-clorometila luego utilizando una modificación del método descrito por Majumdar ("profármacos N-  
15 alquil-N-alquiloxicarbonilaminometilo (NANAOCAM) de fármacos que contienen ácido carboxílico", Bioorg Med Chem Letts (2007) 17: 1447-1450), en los que el carbamato (V) y el paraformaldehído se ponen en contacto en una mezcla de clorotrimetilsilano y un disolvente inerte tal como tetrahidrofurano, 1,2-dicloroetano, dioxano o tolueno. En una realización preferida, el disolvente inerte es tolueno. El catalizador clorotrimetilsilano está presente en un exceso molar de 1 a 10 veces sobre (V), preferiblemente en un exceso molar de 4 veces. La reacción puede realizarse a temperaturas entre 20 y 100 °C, preferiblemente entre 40 y 60 °C, y lo más preferiblemente a 50 °C, bajo atmósfera inerte, y el progreso de la reacción puede controlarse mediante la conversión del N-(clorometil)carbamato (VI) reactivo en una especie estable, por ejemplo, por dilución de una parte alícuota de la mezcla de reacción en etanol que contiene suficiente base de trialkilamina para neutralizar el clorotrimetilsilano seguido de análisis por HPLC del N-(etoximetil)-  
20 carbamato resultante.

25 El SN-38 se alquila en el OH fenólico mediante N-(clorometil)carbamato (VI) para producir el azida-enlazador-SN-38 (VII), ilustrado en la Figura 2. Se puede usar una variedad de bases para desprotonar el fenol y, por lo tanto, efectuar la alquilación, incluyendo alcóxidos tales como terc-butóxido de potasio ( $\text{KO}^t\text{Bu}$ ), amidas metálicas tales como bis(trimetilsililamida) de litio ( $\text{LiHMDS}$ ), hidruros metálicos tales como  $\text{NaH}$ , amidinas tales como 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), y bases de fosfazeno. En realizaciones preferidas, la base es  $\text{KO}^t\text{Bu}$ . SN-38 en un disolvente apropiado se pone en contacto primero con la base a una temperatura entre -20 y 25 °C, preferiblemente entre -20 y 5 °C, y lo más preferiblemente a 4 °C, para producir la sal de fenolato. Luego se pone en contacto el fenolato con N-(clorometil)-carbamato (VI) a una temperatura entre -20 y 25 °C, preferiblemente entre -20 y 5 °C, y lo más preferiblemente a 4 °C, para producir una solución del azida-enlazador-SN-38 (VII). Los disolventes apropiados incluyen THF, DMF y mezclas de los mismos.  
30

35 Como se ilustra en la Figura 3, el azida-enlazador-SN-38 (VII) se convierte en el amino-enlazador-SN-38 (VIII) por reducción de la azida. Esta reducción puede lograrse por varios medios, que incluyen la hidrogenólisis catalítica en presencia de un catalizador metálico tal como paladio o platino; reducción de Staudinger usando una fosfina tal como una trialkilfosfina o triarilfosfina; o reducción de indio en presencia de un silano. Cuando se usan trialkilfosfinas significativamente básicas como la trimetilfosfina, se agrega suficiente ácido para moderar la basicidad de la reacción y así prevenir la escisión prematura del enlazador de eliminación beta. En una realización preferida, se usa ácido trimetilfosfina-acético en THF/agua para convertir (VII) en (VIII).  
40

45 La amina-enlazador-SN-38 (VIII) se conecta a un PEG activado para proporcionar el conjugado (I) como se ilustra en la Figura 4. Los PEG activados adecuadamente tienen cadenas poliméricas terminadas con un grupo funcional

reactivo amina, tal como un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), un éster de pentahalofenilo o un éster de nitrofenilo para producir conjugados de fórmula (I) en la que X está ausente y un carbonato de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de pentahalofenilo o carbonato de nitrofenilo para producir conjugados de fórmula (I) en la que X es O. Alternativamente, un PEG en el que las cadenas de polímero están terminadas con un ácido carboxílico puede usarse en presencia de un agente de acoplamiento peptídico tal como una carbodiimida tipo DCC o EDCI o un reactivo de fosfonio tal como BOP o PyBOP, o un reactivo de uronio tal como HATU o HBTU. El acoplamiento se realiza en condiciones acuosas o anhidras, preferiblemente anhidras en un disolvente adecuado tal como acetonitrilo, THF, DMF o diclorometano. En una realización preferida, se usa un PEG activado que tiene las cadenas de polímero terminadas con un éster de NHS en disolvente THF a temperaturas entre 0 y 25 °C.

Los conjugados resultantes pueden purificarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el conjugado puede precipitarse de la mezcla de reacción mediante la adición de un disolvente etéreo tal como éter etílico o metil terc-butil éter (MTBE). El conjugado también puede purificarse por diálisis o por cromatografía de exclusión por tamaño.

Se describen además métodos para la liberación lenta de SN-38 usando conjugados de fórmula (I). En un aspecto, la vida media para la liberación de SN-38 del conjugado es entre 100 y 1000 horas, preferiblemente entre 300 y 500 horas, y más preferiblemente aproximadamente 400 horas.

En otra realización de la invención, se proporciona un conjugado de la invención para usar en un método para proporcionar exposición a SN-38 continua a bajas dosis a un paciente que requiera de dicha exposición que comprende la administración al paciente. En una realización más específica, se proporciona el conjugado de la invención para usar en este método en el que la concentración de SN-38 libre se mantiene entre 15 y 5 nM entre administraciones una vez a la semana.

Se describe un método para controlar la relación  $C_{m\acute{a}x}/C_{m\acute{i}n}$  de SN-38 observada entre administraciones de un conjugado. La relación  $C_{m\acute{a}x}/C_{m\acute{i}n}$  resultante es menor o igual a 10 entre administraciones una vez a la semana, más preferiblemente menor o igual a 5, y más preferiblemente aproximadamente 2,5.

Como se muestra en la Figura 6, el conjugado de fórmula (II) en el que PEG es un polietilenglicol de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol) de peso molecular promedio 40.000 [es decir, fórmula (I) en la que  $q = 4$ ; X es  $\text{CH}_2$ ;  $\text{R}^1$  es CN; Y =  $\text{CONEt}_2$ , PEG es un poli(etilenglicol) de 4 brazos de peso molecular promedio 40.000; y L es  $(\text{CH}_2)_5$ ] cuando se coloca en tampón de pH 9,4 a 37 °C libera SN-38 libre en un proceso de primer orden que tiene una vida media de 4,5 horas. Se ha demostrado que los enlazadores de eliminación beta usados en este documento muestran una dependencia del pH de velocidad de liberación de primer orden, de modo que la vida media correspondiente para la liberación a pH fisiológico (7,4) puede calcularse en 450 horas.

Como se muestra en la Figura 7, cuando se administró el mismo conjugado a ratas mediante inyección iv se liberó SN-38 libre y siguió un perfil de concentración versus tiempo paralelo al del conjugado con una vida media terminal de aproximadamente 51 horas. Esto se compara con la administración iv directa de SN-38, que muestra una vida media terminal de entre 7 y 34 minutos en ratas (Atsumi, et al., "Pharmacokinetics of SN-38 [(+)-(4S)-4,11-diethyl-4,9-dihydroxy-1Hpyrano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H,12H)-dione], an active metabolite of irinotecan, after a single intravenous dosing of 14C-SN-38 to rats". Biol. Pharm. Bull. (1995) 18:1114-1119; Kato, et al., "Panipenem Does Not Alter the Pharmacokinetics of the Active Metabolite of Irinotecan SN-38 and Inactive Metabolite SN-38 Glucuronide (SN-38G) in Rats", Anticancer Res. (2011) 31:2915-2922). Por lo tanto, los conjugados de la invención extienden significativamente la vida media *in vivo* de SN-38.

Los niveles y la semivida terminal observada de un fármaco liberado de un conjugado son el resultado de la combinación de los parámetros farmacocinéticos del conjugado y el fármaco, siendo la semivida terminal la suma de la eliminación del conjugado y las velocidades de liberación del fármaco en un modelo simple de compartimento (Santi, et al., "Predictable and Tunable Half-life Extension of Therapeutic Agents by Controlled Chemical Release from Macromolecular Conjugates", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2012) 109:6211-6216). Para determinar estos parámetros, los datos se analizaron usando un modelo farmacocinético en el que el conjugado se distribuye entre dos compartimentos y se puede liberar SN-38 libre antes de eliminarse. Para establecer la velocidad de eliminación del conjugado mismo ( $k_{el}$ ), se administró el conjugado estable análogo (fórmula (II) en la que  $\text{CH}_2\text{CN}$  está ausente) en forma iv a ratas y los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron utilizando un modelo de dos compartimentos.

Como se muestra en la Figura 7, los datos de concentración versus tiempo son consistentes con el conjugado (II) que libera SN-38 libre *in vivo* con una vida media de aproximadamente 400 horas. Después de una inyección única de conjugado (II) en ratas a 200 mg/kg (que comprende 7 mg/kg de SN-38), se observó que los niveles en plasma de SN-38 abarcan 210-20 nM durante 7 días (es decir,  $C_{m\acute{a}x}/C_{m\acute{i}n} = 10$ ). La vida media terminal del conjugado y, en correspondientemente la del SN-38 libre está limitada por la velocidad de eliminación relativamente rápida del conjugado en la rata. La tasa de eliminación de un conjugado de PEG depende de la especie debido a las tasas diferenciales de filtración renal, con una vida media terminal de un PEG de 40.000 Da, de aproximadamente 12 horas en ratón, 24-48 horas en ratas y 72-120 horas en humanos. Además, suele darse el caso de que las tasas de eliminación de fármacos son más lentas en pacientes humanos que en ratas (véase, por ejemplo, Caldwell, et al.,



"Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: can human CL, Vss and  $t_{1/2}$  be predicted from in-vivo rat data?", Eur J Drug Metab Pharmacokinet. (2004) 29:133-143). Por lo tanto, se espera que la vida media terminal de SN-38 liberado de un conjugado de fórmula (I) sea sustancialmente más larga en humanos que en roedores, a pesar de que se espera que la tasa de liberación del fármaco del conjugado sea relativamente independiente de la especie debido a la consistencia de los valores de pH en sangre. Si bien se desconocen los parámetros farmacocinéticos reales para los conjugados de la invención y de SN-38 libre en pacientes humanos, la estimación de estos valores mediante escalamiento alométrico proporciona una estimación de  $C_{m\acute{a}x}/C_{m\acute{i}n} \sim 2,5$  en pacientes humanos como se describe a continuación en el Ejemplo 5. La infusión prolongada del profármaco SN-38 irinotecano en pacientes humanos ha indicado que se puede obtener la máxima eficacia si los niveles en plasma de SN-38 se mantienen entre aproximadamente 5 y 15 nM durante períodos prolongados. Los datos farmacocinéticos de ratas predicen por lo tanto que los conjugados de la invención permiten la liberación de niveles continuos bajos y eficaces de SN-38.

Sorprendentemente, los niveles de SN-38G observados al tratar ratas con el conjugado de fórmula (II) fueron extremadamente bajos, con SN-36G/SN-38  $\leq 0,1$  a  $C_{m\acute{a}x}$ . Esto contrasta con el tratamiento con conjugados de irinotecano unidos a éster (SN-38G/SN-38  $\sim 15$  a  $C_{m\acute{a}x}$ ; Eldon, et al., "Population Pharmacokinetics of NKTR-102, a Topoisomerase Inhibitor-Polymer Conjugate in Patients With Advanced Solid Tumors", American Society of Clinical Oncology Poster 8E (2011)), o con conjugados de SN-38 unidos a éster (SN-38G/SN-38  $\sim 1$  a  $C_{m\acute{a}x}$ ; Patnaik, et al., "EZN-2208, a novel anticancer agent, in patients with advanced malignancies: a Phase 1 dose-escalation study", American Association for Cancer Research Poster C221 (2009)). Por lo tanto, parece que SN-38 se glucuronida con menos eficacia cuando se libera muy lentamente. De acuerdo con esta hipótesis, cuando se examinó un conjugado que tenía  $R1 = PhSO_2$  en ratas, se observó una liberación más rápida de SN-38 ( $t_{1/2} = 10$  h) como se esperaba, concomitante con niveles iniciales más altos de SN-38 libre y un mayor SN-38G/SN-38 = 0,2 a  $C_{m\acute{a}x}$ .

Se describen métodos para minimizar la cantidad de glucurónido de SN-38 formado tras la administración de SN-38 mediante el control de la velocidad de liberación de SN-38 de un conjugado. Se describe un método para minimizar la cantidad de glucurónido de SN-38 formado tras la administración de SN-38 en el que se proporciona un conjugado caracterizado por una vida media para la liberación de SN-38 de más de 100 horas. En un aspecto más específico, la vida media para la liberación de SN-38 es de entre 100 y 1.000 horas. En un aspecto preferido, la vida media para la liberación de SN-38 es de entre 300 y 500 horas. En un aspecto aún más preferido, la vida media para la liberación de SN-38 es de aproximadamente 400 horas.

Los conjugados de la invención pueden formularse usando una variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica, y se formulan convenientemente en tampón acuoso que tiene un pH óptimo para la estabilidad del conjugado. En una realización de la invención, los conjugados se formulan en tampón acuoso a un valor de pH entre 4 y 6. Se ha encontrado inesperadamente que los conjugados de fórmula (I) son significativamente más solubles en tampón acuoso que los conjugados relacionados descritos en el documento WO2011/140393 (véase el ejemplo 2 a continuación), lo que permite un mayor intervalo de dosificación a pacientes que necesitan terapia con estos compuestos.

Se espera que los conjugados de la invención encuentren utilidad en cualquier situación en la que SN-38 o un profármaco de SN-38, por ejemplo irinotecano, tengan utilidad. En la actualidad, el irinotecano se usa en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo leucemia, linfoma, cáncer colorrectal, de pulmón, de ovario, cervical, pancreático, de estómago y de mama, por lo que se anticipa que los conjugados de la invención pueden usarse de manera similar.

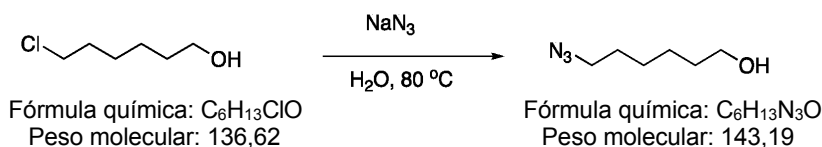
En una realización alternativa ilustrada en el Ejemplo 6, una formulación de SN-38 proporciona una forma solubilizada cuando los excipientes incluyen PEG y DMSO. Esto es particularmente útil para la infusión continua, por ejemplo. La relación de PEG a DMSO varía de 90:10 a 10:90, pero también puede ser 75:25, 25:75 o 50:50 o valores intermedios de los mismos. Los componentes útiles de PEG varían de aproximadamente PEG100 (100)-PEG (600).

#### Ejemplos

General: la HPLC se realizó usando un sistema de HPLC Shimadzu con detección de matriz de diodos. La fase inversa utilizó una columna Phenomenex® Jupiter 5  $\mu$ m 300A 4,6x150 mm termostataada a 40 °C, con un gradiente de acetonitrilo 20-100% en agua que contenía 0,1% de TFA a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La HPLC de exclusión por tamaño usó una columna Phenomenex® BioSep<sup>MR</sup> S-2000 operando con 50:50 de acetonitrilo/agua/0,1% de TFA a 40 °C. Las soluciones que contenían SN-38 se cuantificaron por absorbancia UV a 363 nm en acetonitrilo usando  $\epsilon = 22.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . SN-38 se adquirió a través de Haorui (China).

#### Preparación A

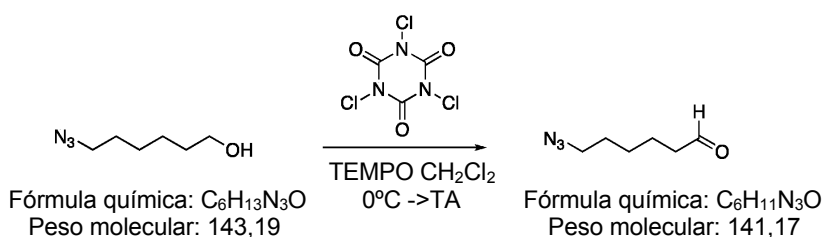
6-azida-1-hexanol



5 Una mezcla de 6-cloro-1-hexanol (50,0 g, 366 mmol) y azida de sodio (65,0 g, 1000 mmol) en 400 mL de agua se calentó a reflujo suave durante 19 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se extrajo con 3 veces con 200 mL de EtOAc. El extracto se lavó 1 vez con 100 mL de agua, 1 vez con 100 mL de una solución acuosa saturada de NaCl, luego se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se evaporó para producir 44,9 g (86%) de un aceite incoloro. RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3,66 (2H, br t, J = 6 Hz), 3,27 (2H, t, J = 7,2 Hz), 1,55-1,66 (m, 4H), 1,38-1,44 (m, 2H).

Preparación B

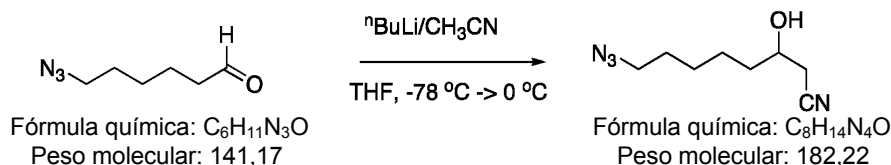
6-azidahexanal



15 Se añadió ácido tricloroisocianúrico (12,2 g, 52,5 mmol) a una solución agitada vigorosamente de 6-azida-1-hexanol (7,2 g, 50,0 mmol) en 100 mL de diclorometano enfriado sobre hielo. Se añadió gota a gota una solución de TEMPO (0,080 g, 0,51 mmol) en 2 mL de diclorometano a la suspensión resultante. Después de 10 minutos a 4 °C, la suspensión se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos adicionales. El análisis por TLC (30% de EtOAc/hexano) indicó reacción completa. La suspensión se filtró a través de una almohadilla de Celite de 1 cm usando diclorometano. El filtrado se lavó 2 veces con 100 mL de  $Na_2CO_3$  1 M, 1 vez con 100 mL de agua, 1 vez con 100 mL de HCl 1 N y 1 vez con 100 mL de una solución acuosa saturada de NaCl, luego se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se evaporó para producir 9,8 g de un aceite anaranjado. Este se disolvió en un volumen pequeño de diclorometano y se cromatógrafió en  $SiO_2$  (80 g) usando un gradiente de 0-20% de EtOAc/hexanos para proporcionar 6,67 g (47,3 mmol; 95%) del aldehído como un aceite incoloro. RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  9,78 (1H, t, J = 1,6 Hz), 3,29 (2H, t, J = 6,8 Hz), 2,47 (2H, dt, J = 1,6, 7,6 Hz), 1,59-1,71 (m, 4H), 1,38-1,46 (m, 2H).

Preparación C

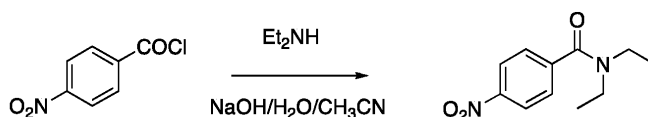
7-azida-1-ciano-2-heptanol



40 Se añadió una solución 1,6 M de n-butillitio en hexano (35 mL, 49 mmol) a 100 mL de THF anhidro bajo  $N_2$  a -78 °C. Se añadió acetonitrilo (3,14 mL, 60 mmol) en una corriente rápida con agitación vigorosa, dando como resultado la formación de una suspensión blanca. Después de 15 min, la suspensión se dejó calentar a -20 °C durante más de 1 hora. Después de enfriar nuevamente a -78 °C, se añadió 6-azidahexanal (6,67 g, 47 mmol) dando como resultado una solución amarilla. Esta se agitó durante 15 minutos adicionales, luego se dejó calentar a -20 °C y se inactivó mediante la adición de 20 mL de solución acuosa saturada de  $NH_4Cl$ . Después de la dilución con EtOAc, la mezcla se lavó secuencialmente con agua, HCl 1 N, agua y solución acuosa saturada de NaCl, luego se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se evaporó para producir 8,0 g de un aceite amarillo. Este se disolvió en un pequeño volumen de diclorometano y se cromatógrafió sobre  $SiO_2$  (80 g) usando un gradiente de 0-40% de EtOAc/hexanos de para proporcionar 6,0 g (21,6 mmol; 84%) del producto como un aceite incoloro. RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  5,18 (1H, d, J = 5 Hz), 3,69 (1H, m), 3,32 (2H, t, J = 6 Hz), 2,60 (1H, dd, J = 4,8, 16,4 Hz), 2,51 (1H, dd, J = 6,4, 16,4 Hz), 1,55 (2H, m), 1,42 (2H, m), 1,30 (4H, m).

Preparación D

4-Nitrobenzamida de N,N-dietilo



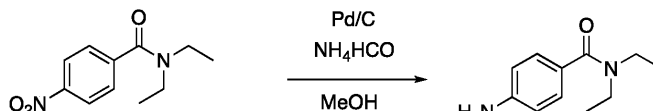
Fórmula química:  $C_7H_4ClNO_3$   
 Peso molecular: 185,56

Fórmula química:  $C_{11}H_{14}N_2O_3$   
 Peso molecular: 222,24

5 Se añadió gota a gota una solución de cloruro de 4-nitrobenzoilo (18,6 g, 100 mmol) en 100 mL de acetonitrilo durante 30 minutos a una solución agitada de dietilamina enfriada sobre hielo (15,5 mL, 150 mmol) e hidróxido de sodio (6,0 g, 150 mmol) en 150 mL de agua. Después de completar la adición, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora adicional. La mezcla se extrajo 3 veces con 100 mL de  $CH_2Cl_2$ , y el extracto combinado se lavó 1 vez con 100 mL de agua, 1 vez con 100 mL de HCl 1 N y salmuera. Después de secar sobre  $MgSO_4$ , la mezcla se filtró y se evaporó a sequedad para producir una masa cristalina. La recrystalización en hexano/acetato de etilo 80/20 proporcionó 20,0 g de producto en forma de cristales de color amarillo pálido (90%). RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8,27 (2H, m), 7,54 (2H, m), 3,57 (2H, br q, J = 6,8 Hz), 3,21 (2H, br q, J = 6,8 Hz), 1,27 (3H, br t, J = 6,8 Hz), 1,12 (3H, br t, J = 6,8 Hz).

Preparación E

4-(N,N-dietilcarboxamido)anilina



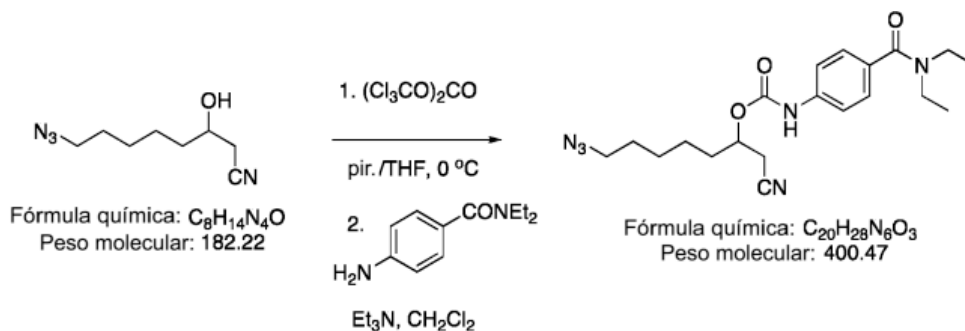
Fórmula química:  $C_{11}H_{14}N_2O_3$   
 Peso molecular: 222,24

Fórmula química:  $C_{11}H_{16}N_2O$   
 Peso molecular: 192,26

20 Se añadió formiato de amonio (20,0 g, 317 mmol) a una mezcla agitada vigorosamente de N,N-dietil-4-nitrobenzamida (20,0 g, 90 mmol) y 1,0 g de 10% de paladio/carbón en 400 mL de metanol enfriado sobre hielo. La reacción se calienta con una fuerte evolución de gas. Después de 1 hora, la TLC (hexano/EtOAc 60/40) indicó la conversión completa del material de partida. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite y se evaporó hasta un sólido cristalino. Este se suspendió en agua y se recogió por filtración al vacío. El producto se recrystalizó en agua y se secó para proporcionar 14,14 g (83%) de cristales blancos. RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7,22 (2H, m), 6,65 (2H, m), 3,81 (2H, br s), 3,42 (4H, br s), 1,17 (6H, t, J = 6,8 Hz).

Preparación F

4-(N,N-dietilcarboxamido)fenilcarbamato de 1-ciano-7-azida-2-heptilo



Fórmula química:  $C_8H_{14}N_4O$   
 Peso molecular: 182,22

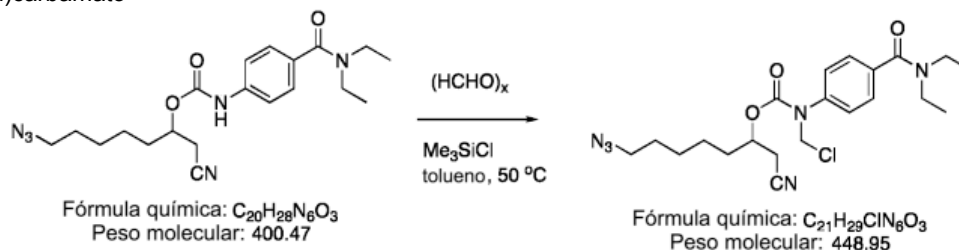
Fórmula química:  $C_{20}H_{28}N_8O_3$   
 Peso molecular: 400,47

40 Se añadió piridina (4,0 mL, 50 mmol) gota a gota bajo atmósfera inerte a una solución agitada de 1-ciano-7-azida-2-heptanol (4,60 g, 25 mmol) y trifosgeno (12,5 g, 42 mmol) en 200 mL de THF anhidro enfriado sobre hielo. La suspensión blanca se agitó durante 15 minutos sobre hielo, luego se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos adicionales. El análisis por TLC (hexano/acetato de etilo 60:40) indicó la conversión completa del material de partida en un producto con alto  $R_f$ . La suspensión se filtró y se evaporó, y el residuo se recogió en 100 mL de éter seco, se filtró y se evaporó para producir el cloroformiato sin procesar (4,54 g, 74%) como un aceite marrón. Se añadió trietilamina (3,5 mL, 25 mmol) a una solución de cloroformiato (18,6 mmol) y 4-(N,N-dietilcarboxamido)anilina (3,85 g, 20 mmol) en 100 mL de  $CH_2Cl_2$  seco. Después de agitar durante 1 hora, la mezcla se lavó 2 veces con HCl 1 N, 2 veces con agua y 1 vez con salmuera, luego se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se evaporó hasta un aceite que cristalizó al reposar. La masa cristalina se lavó con hexano/acetato de etilo 60/40. Los lavados se concentraron y se cromatografió sobre sílice usando un gradiente de 0-80% de acetato de etilo/hexano.

Las fracciones del producto se concentraron y se combinaron con el material cristalino inicial. El producto combinado se recrystalizó en acetato de etilo/hexano 1:1 para producir el carbamato como un sólido cristalino blanco (4,4 g, 44% para 2 etapas). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7,45-7,35 (4H, m), 6,888 (1H, br s), 5,000 (1H, m), 3,52 (4H, br), 3,288 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz), 2,841 (1H, dd,  $J = 5,2, 17$  Hz), 2,327 (1H, dd,  $J = 4,4, 17$  Hz), 1,88 (1H, m), 1,75 (1H, m), 1,63 (2H, m), 1,45 (4H, m), 1,18 (6H, br).

## Preparación G

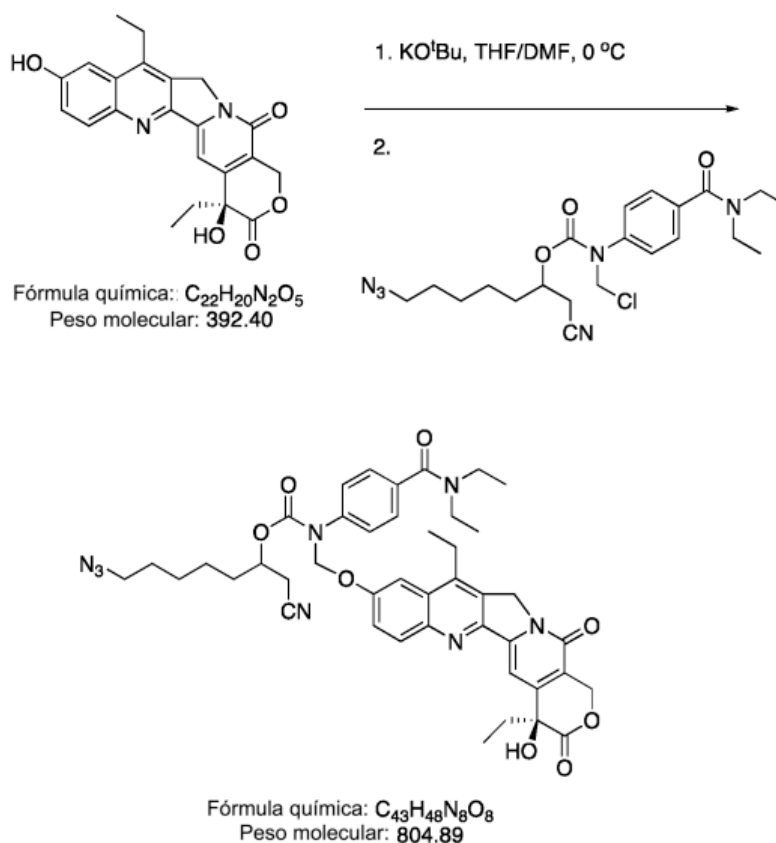
## N-(clorometil)carbamato



Una suspensión de N-(clorometil)-4-(N,N-dietilcarboxamido)-fenilcarbamato de 7-azida-1-ciano-2-hexilo (2,00 g, 5,0 mmol), paraformaldehído (225 mg, 5,5 mmol, 1,5 Eq.), clorotrimetilsilano (2,5 mL, 20,0 mmol, 4,0 Eq.), y 25 mL de tolueno anhidro se colocó bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  en un RBF de 50 mL equipado con una barra de agitación magnética y se cerró con una tapa con tabique de goma. El matraz sellado se calentó en un baño de aceite a 50 °C durante 24 horas, momento en el que se obtuvo una solución amarilla transparente. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó. El residuo se redisolvió en 10 mL de tolueno seco, se filtró y se evaporó para proporcionar el N-(clorometil)-carbamato sin procesar como un aceite amarillo inestable que contenía tolueno residual (2,68 g, 119% de lo esperado). Este material se disolvió en 10 mL de THF anhidro y se almacenó bajo  $\text{N}_2$ . La formación de N-(clorometil)carbamato se confirmó mediante la adición de 5  $\mu\text{L}$  a 1,0 mL de N,N-diisopropiltilamina 4 mM en etanol, seguido de un análisis por HPLC de fase inversa (Phenomenex Jupiter 300A 4,6x150 mm  $\text{C}_{18}$ ; 1,0 mL/min; gradiente de 20-100%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0,1\%$  de TFA durante 10 min). El carbamato de partida eluye a 8,42 min y muestra  $\lambda_{\text{máx}}$  231 nm; una impureza desconocida eluye a 8,04 min y muestra  $\lambda_{\text{máx}}$  245 nm. La integración del pico a 240 nm indicó aproximadamente 89% de N-(etoximetil)-carbamato. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,39 (4H, m), 5,54 (1H, d,  $J = 12$  Hz), 5,48 (1H, d,  $J = 12$  Hz), 4,99 (1H, m), 3,51 (4H, br), 3,26 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz), 2,79 (1H, m), 2,63 (1H, m), 1,85 (1H, m), 1,73 (1H, m), 1,60 (2H, m), 1,43 (4H, m), 1,16 (6H, br).

## Preparación H

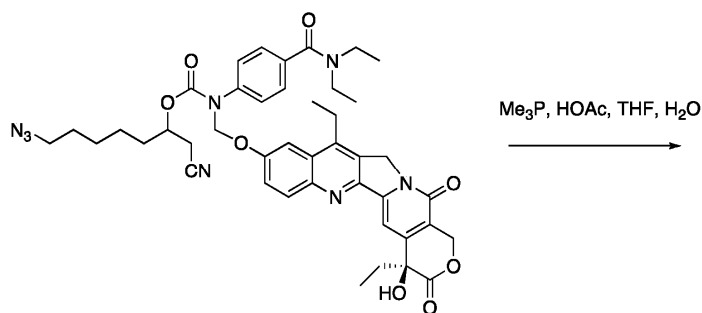
## Azida-enlazador-SN-38



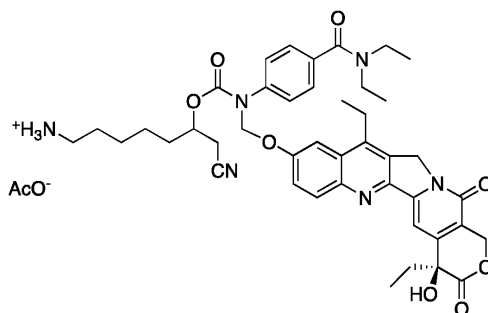
Se suspendió SN-38 (1,00 g, 2,55 mmol; Haorui) en 10 mL de piridina anhidra, y luego se concentró a sequedad al vacío (temperatura del baño 50 °C). Esto se repitió con 10 mL de THF anhidro. El sólido amarillo pálido resultante se disolvió en 50 mL de THF anhidro y 50 mL de DMF anhidro en atmósfera de N<sub>2</sub>, y luego se enfrió en hielo. Se añadió una solución 1,0 M de terc-butóxido de potasio en THF (2,55 mL, 2,55 mmol) formando un color verde oscuro inicial que cambió a una suspensión naranja espesa. Después de 15 minutos, se añadió una solución en THF del N-(clorometil)-carbamato (7,5 mL, 2,8 mmol). Después de 15 minutos a 4 °C, la mezcla naranja clara se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, el análisis por HPLC (5 µL de muestra + 1 mL de acetonitrilo/TFA al 0,1%) indicó producto/SN-38 86/14. La mezcla amarilla pálida se diluyó con 200 mL de acetato de etilo, se lavó 2 veces con 100 mL de agua, 100 mL de solución acuosa saturada de NaCl, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El exceso de DMF se eliminó por trituración del residuo aceitoso con agua, y el residuo se disolvió en 50 mL de acetonitrilo, se filtró y se evaporó para producir 2,96 g de vidrio amarillo. El residuo se cromatografió en SiO<sub>2</sub> (80 g) usando un gradiente escalonado de 200 mL cada vez de hexano, 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de acetona en hexano, proporcionando el azida-enlazador-SN-38 purificado (1,66 g, 81%). Este material se disolvió en 50 mL de acetona y se añadieron gota a gota 45 mL de ácido acético al 0,1% en agua con agitación hasta que la mezcla se volvió turbia. Al agitar, se separó un material sólido. Luego se agregaron 5 mL adicionales de ácido acético al 0,1% en agua para completar la precipitación. Después de agitar durante 2 horas, el sólido se recogió por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó para proporcionar 1,44 g (70%) de polvo amarillo pálido. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,15 (1H, d, J = 9,2 Hz), 7,60 (1H, s), 7,48 (1H, dd, J = 2,9 Hz), 7,40 (4H, m), 7,25 (1H, d, J = 2), 5,75 (2H, br), 5,73 (1H, d, J = 16 Hz), 5,28 (1H, d, J = 16 Hz), 5,22 (2H, s), 4,99 (1H, m), 3,84 (1H, s), 3,53 (2H, br), 3,53 (2H, br), 3,17 (2H, t, J = 7 Hz), 3,12 (2H, q, J = 7 Hz), 2,74 (1H, dd, J = 1, 17 Hz), 2,54 (1H, dd, J = 5, 17), 1,86 (2H, m), 1,6 (1H, m), 1,46 (1H, m), 1,37 (3H, t, J = 7 Hz), 1,25 (6 H, m), 1,12 (4 H, m), 1,02 (3H, t, J = 7,3 Hz). LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 805,3 (calculado para C<sub>44</sub>H<sub>51</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub> = 805,3).

## Ejemplo 1

Sal de acetato de amino-enlazador-SN-38



Fórmula química  $C_{43}H_{48}N_8O_8$   
Peso molecular: 804,89



Fórmula química  $C_{45}H_{54}N_6O_{10}$   
Peso molecular: 838,94

5

Se añadió una solución 1 M de trimetilfosfina en THF (2,9 mL, 2,9 mmol) a una solución de azida-enlazador-SN-38 (1,13 g, 1,4 mmol) y ácido acético (0,19 mL, 3,3 mmol) en 10 mL de THF. El gas evolucionó lentamente. Después de agitar durante 2 horas, se añadió agua (1,0 mL) y la mezcla se agitó durante 1 hora adicional. El residuo se repartió entre éter y agua. La fase acuosa se lavó una vez con acetato de etilo, y la fase acuosa amarilla clara resultante se evaporó para proporcionar 800 mg de espuma amarilla. Esta se disolvió en THF, se filtró y se cuantificó mediante absorbancia UV para proporcionar una solución que contenía 1,2  $\mu$ mol (86%) de producto. La HPLC  $C_{18}$  mostró un pico único, y la LC-MS mostró  $[M + H]^+ = 779,3$  (esperado 779,4).

10

15

### Ejemplo 2

SN-38 conjugado con el compuesto (III) en el que  $m = 1$  y  $n \sim 225$

20

25

30

Una mezcla de tetra-(succinimidil-carboximetil)-PEG de 4 brazos de 40 kDa (tecnología JenKem; 10,0 g, 1,0 mmol de HSE), la sal de acetato de amino-enlazador-SN-38 del Ejemplo 1 (1,2 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (0,21 mL, 1,2 mmol) en 75 mL de THF se mantuvo a temperatura ambiente. El progreso del acoplamiento se controló por HPLC, que indicó la finalización de la reacción en 90 minutos. Después de un total de 2 horas, la mezcla se filtró en 500 mL de MTBE agitado. El precipitado se recogió por filtración al vacío, se lavó con MTBE y se secó al vacío para proporcionar el conjugado como un sólido de color amarillo pálido ceroso (10,1 g, 95%). El análisis espectrofotométrico de una muestra de 2,0 mg en 1,0 mL de agua indicó SN-38 0,17 mM; con base en el SN-38 0,175 mM calculado esperado en peso, esto indica una carga conjugada del 96%. El análisis por HPLC  $C_{18}$  indicó un único pico principal (98% del área de pico total a 363 nm; 97% a 256 nm), con 0,6% en moles de SN-38 libre.

35

40

Este conjugado era soluble a 1,9 mM (85 mg/mL) en tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 5,0. Por el contrario, el conjugado correspondiente en el que el azida-enlazador-SN-38 de la preparación H se había conectado a PEG<sub>40 kDa</sub>-(DBCO)<sub>4</sub> a través de un enlace triazol (documento WO2011/140393) era soluble a solo 0,7 mM (32 mg/mL). La solubilidad del conjugado del ejemplo 2 también se probó a pH 4 y pH 5 en tampón de acetato 0,2 N y a pH 6, pH 7 y pH 8 en tampón de fosfato 0,2 N. Se encontró que la solubilidad era mayor que 300 mg/mL a todos estos pH. Sin embargo, el pH se alteró ligeramente cuando se disolvió el conjugado y generalmente aumentó sobre el valor original. Por lo tanto, cuando se disolvieron 300 mg/mL del conjugado en tampón de pH 4, el pH se convirtió en 4,5; en tampón de pH 5, el pH se convirtió en 5,4; en tampón de pH 6, el pH se convirtió en 6,2; en el tampón de pH 7, el pH se convirtió en 7,2 y en el tampón de pH 8, el pH se convirtió en 7,7.

45

La estabilidad también se probó cuando se disolvieron 10 mg/mL del conjugado a temperatura ambiente con tampones de pH 4,7 - pH 8 y en agua y se mantuvo a temperatura ambiente durante siete días. La HPLC determinó la pureza del conjugado en los diversos tampones.

Normalmente, la pureza en el día 0 se midió en algo menos del 100%, típicamente alrededor del 97%. Hubo poco o

ningún cambio en la pureza medida durante siete días a cualquier pH probado en agua.

### Ejemplo 3

#### 5 Cinética de liberación *in vitro*

Una solución del conjugado del Ejemplo 2 en borato de sodio 0,1 M, pH 9,4, se mantuvo en una cubeta UV sellada a 37 °C. El aumento de la absorbancia a 414 nm debido a la formación de fenóxido de SN-38 libre se controló con el tiempo. El ajuste de los datos a una única  $A_{m\acute{a}x} \cdot (1 - e^{-kt})$  exponencial proporcionó la constante de velocidad para la liberación de SN-38, k, del conjugado a pH 9,4, donde  $A_{m\acute{a}x}$  es la absorbancia en la reacción completa. Como se muestra en la Figura 6, la formación de SN-38 libre siguió una cinética de primer orden con  $k = 0,00257 \text{ min}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 270 \text{ min}$ ) a pH 9,4. Como se sabe que la velocidad de liberación de estos enlazadores es de primer orden en hidróxido, la velocidad de liberación a otros valores de pH se puede calcular como  $k(\text{pH}) = k_{9,4} \cdot 10^{(\text{pH} - 9,4)}$ . Por lo tanto, la tasa de SN-38 a pH 7,4 se calcula que es  $2,57 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ , o  $t_{1/2} = 450 \text{ horas}$  a pH 7,4, 37 °C.

### Ejemplo 4

#### Farmacocinética *in vivo*

Una solución de 45 mg/mL del conjugado del Ejemplo 2 en tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, se filtró en forma estéril y se inyectó en ratas Sprague-Dawley hembra con cánulas (n = 3) a razón de 200 mg/kg, y se recogieron muestras de sangre (0,3 mL) periódicamente y se añadieron inmediatamente a 30  $\mu\text{L}$  de una solución de citrato 1 M/Pluronic® F68 al 0,1%, pH 4,5 para reducir el pH de la muestra, coagular y estabilizar el conjugado intacto restante. Las muestras se centrifugaron a aproximadamente 1.500 x g (fuerza) durante 10 minutos a una temperatura de 2 a 8 °C para eliminar los glóbulos rojos y obtener ~ 150  $\mu\text{L}$  de plasma. El plasma se dividió en 2 alícuotas y se transfirió a viales criogénicos y se almacenó en un congelador a -80 °C antes del análisis.

Para el análisis, las muestras se descongelaron en hielo y se mezclaron con 2 volúmenes de acetonitrilo/ácido acético al 0,5% que contenía 8 ng/mL de camptotecina como patrón interno. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 16.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes de la muestra (20  $\mu\text{L}$ ) se analizaron utilizando una columna de HPLC Jheniter Phenomenex® 300Å 5  $\mu\text{m}$  150 x 4,6 mm  $\text{C}_{18}$  termostataada a 40 °C utilizando un gradiente de fosfato de sodio 100 mM, sulfato de heptano 3 mM, pH 4,0 (Tampón A) y 75 % de acetonitrilo en agua (tampón B) a razón de 1,0 mL/min. El gradiente consistió en 5% de B isocrático durante 3 min, 20% de B isocrático durante 3 min, gradiente lineal de 20-40% B durante 5 min, gradiente lineal de 40-100% de B durante 2 min, 100% de B isocrático durante 3 min, 5% de B isocrático durante 3 min. La elución de la muestra fue seguida con un detector de matriz de diodos y un detector de fluorescencia con excitación establecida a 370 nm y la emisión establecida a 470 nm durante los primeros 9 min seguido de emisión a 534 nm durante los 10 min finales. Las concentraciones se calcularon comparando las áreas de los picos con las curvas estándar del conjugado (absorbancia 380 nm) y SN-38 (fluorescencia Excitación: 370 nm; Emisión: 534 nm). Se observaron los siguientes tiempos de retención: SN-38, 12,7 min; camptotecina, 13,2 min; y conjugado, 14,5 min. Se determinó que los límites inferiores de cuantificación eran de SN-38 a una altura máxima de 10 veces la relación señal/ruido mediante detección por fluorescencia: 0,07 pmoles en 20  $\mu\text{L}$  de inyección de plasma tratado con acetonitrilo (3,3 nM en plasma tratado con acetonitrilo, 10 nM en una muestra de plasma original). Conjugado: 2,1 pmoles de conjugado (8,4 pmoles de SN-38) en 20  $\mu\text{L}$  de plasma tratado con inyección de acetonitrilo (conjugado 100 nM; SN-38 400 nM) en plasma tratado con acetonitrilo, 300 nM (SN-38 1200 nM) en muestra de plasma original.

Para obtener información sobre la eliminación del conjugado intacto del plasma, se realizó un experimento similar usando el conjugado estable análogo (fórmula (II) en la que  $\text{CH}_2\text{CN}$  está ausente) a 22 mg/kg.

Los niveles de glucuronido de SN-38 se determinaron de acuerdo con el método de Poujol, et al., "Sensitive HPLC-Fluorescence Method for Irinotecan and Four Major Metabolites in Human Plasma and Saliva: Application to Pharmacokinetic Studies", *Clinical Chemistry* (2003) 49:1900-1908.

### Ejemplo 5

#### 55 Modelado farmacocinético

Los datos de concentración en plasma frente al tiempo para el conjugado se analizaron usando un modelo de dos fases en el  $C(t) = A \cdot \exp(-\alpha t) + B \cdot \exp(-\beta t)$  en la que  $A + B = \text{dosis}/V_d$ . Los datos se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal (pendiente simplex de Nelder-Mead), luego los parámetros se desconvolvieron de acuerdo con los procedimientos establecidos para proporcionar estimaciones de las tasas de transferencia entre compartimentos ( $k_{12}$  y  $k_{21}$ ) y la tasa de eliminación del conjugado del compartimento central ( $K_{el}$ ). El análisis de los datos para el conjugado del Ejemplo 2 y el correspondiente conjugado estable (en el que  $\text{CH}_2\text{CN}$  se reemplaza por H) produjo los datos en la Tabla 1.

65

Tabla 1  
Liberable                      Estable

$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{M}$ )	622	59
$\alpha$ $t_{1/2}$ (h)	3,8	1,2
$\beta$ $t_{1/2}$ (h)	49	56
$k_{12}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,09	0,35
$k_{21}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,07	0,21
$k_{el}$ $t_{1/2}$ (h)	18	20
$V_d$ (L/kg)	0,10	0,12

5 Usando estos parámetros, los datos de concentración de SN-38 libre se ajustaron luego con base en un modelo en el que el conjugado libera SN-38 libre con constante de velocidad  $k_1$  y se equilibra con un segundo compartimento con  $K_{dist} = V_d/V_c$ . Las curvas modelo se generaron mediante integración numérica utilizando las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\Delta [C_c] = (-k_1[C_c] - k_{12}[C_c] - k_{el}[C_c] + k_{21}[C_p]) \Delta t$$

$$10 \quad \Delta [C_p] = (k_{12}[C_c] - k_{21}[C_p]) \Delta t$$

$$\Delta [D_c] = (k_1[C_c] - k_{cl}[D_c]) / (1 + K_{dist}) \Delta t$$

$$15 \quad K_{dist} = V_d/V_c$$

15 Cuando  $[C_c]$  y  $[C_p]$  son las concentraciones de SN-38 conjugado en los compartimentos central y periférico, respectivamente,  $[D_c]$  es la concentración de SN-38 libre en el compartimento central, y las constantes de velocidad son como describió anteriormente;  $k_{cl}$  es la constante de velocidad para la eliminación de SN-38 libre del plasma, y se permitió que variara dentro del intervalo informado para este parámetro ( $1,4 - 3,5 \text{ h}^{-1}$ ). La integración numérica se realizó en 1000 etapas durante un lapso de tiempo de 120 horas ( $\Delta t = 0,12 \text{ h}$ ) con condiciones iniciales  $[C_c] = C_{m\acute{a}x}$ ,  $[C_p] = 0$  y  $[D_c] = 0$ . El volumen de distribución  $V_d$  para SN-38 se estableció en el valor informado de  $0,18 \text{ L/kg}$ , mientras que  $V_c$  se estableció como  $V_d$  para el conjugado.

25 Usando este método, los datos de concentración versus tiempo para SN-38 conjugado y SN-38 libre liberado del conjugado se ajustaron como se muestra en la Figura 7. Se obtuvo un buen acuerdo con los datos experimentales cuando  $k_{cl} = 2,77 \text{ h}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0,25$  horas) para la eliminación de SN-38 libre del plasma, dentro del intervalo informado, y cuando  $k_1$  se estableció en  $0,00173 \text{ h}^{-1}$ , el valor medido *in vitro* ( $t_{1/2} = 400$  horas para la escisión de SN-38 del conjugado).

30 Usando este modelo, el comportamiento del conjugado en otras especies puede predecirse dados los valores de  $k_{el}$  y  $k_{cl}$  en esas especies. En humanos, los valores para la eliminación de PEG ( $k_{el}$ ) y SN-38 ( $k_{cl}$ ), así como el volumen de distribución, no se han informado, pero pueden estimarse usando una escala alométrica para ser aproximadamente  $k_{el} = 0,0087 \text{ h}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  80 horas) y  $k_{cl} = 0,7 \text{ h}^{-1}$  ( $t_{1/2}$  1 hora), y  $V_{ss} = 0,15 \text{ L/kg}$  (Caldwell et al., "Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: can human CL, Vss and  $t_{1/2}$  be predicted from in-vivo rat data?", Eur J Drug Metab Pharmacokinet. (2004) 29:133-143.) El uso de estos valores en el modelo farmacocinético proporciona intervalos de concentración estimados de SN-38 libre produciendo un  $C_{m\acute{a}x}/C_{min} \sim 2,5$ .

#### Ejemplo 6

#### 40 Formulación de SN-38 para infusión continua

45 La administración terapéutica de SN-38 ha sido limitada por la escasa solubilidad acuosa de este fármaco ( $7 \text{ mg/L}$  en agua,  $18 \mu\text{M}$ ). Se desarrolló una formulación para superar esta limitación. Para determinar la solubilidad de SN-38 en diversas formulaciones, se diluyó una solución  $115 \text{ mM}$  de SN-38 en dimetilsulfóxido (DMSO) para producir concentraciones objetivo de  $15, 10, 5$  y  $2 \text{ mM}$  en diversas formulaciones (Tabla 2). Después de reposar durante  $16$  horas a temperatura ambiente, el SN-38 precipitado se retiró por centrifugación a  $14.000 \text{ rpm}$  durante  $30 \text{ min}$ . El sobrenadante se diluyó  $1:200$  en borato  $100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 10,0$ , y la concentración de SN-38 se determinó espectrofotométricamente a  $414 \text{ nm}$  usando  $\epsilon_{414} = 22.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Los resultados se presentan en la Tabla 2.

50 Tabla 2  
Porcentaje de excipientes en volumen en las formulaciones

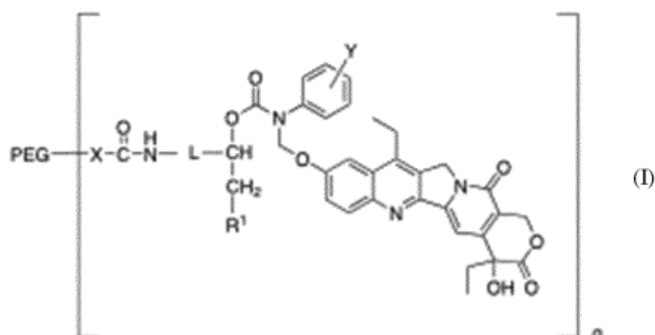
	A	B	C	D	E	F
PBS, pH 7,4	75	50	35	20	-	-
DMSO	25	50	50	50	50	10
Etanol	-	-	15	30	-	-
PEG300	-	-	-	-	50	90
Solubilidad ( $\mu\text{M}$ )	210	570	760	2600	$\geq 9300$	$\geq 4600$



- 5 El SN-38 en las formulaciones E y F permaneció completamente soluble a las concentraciones más altas probadas. Se espera que los polietilenglicoles que no sean PEG300 puedan usarse con una ventaja similar. Se espera además que estas formulaciones farmacéuticas puedan usarse para mantener una exposición continua a SN-38 para un paciente que necesite dicha exposición, administrando la formulación farmacéutica por infusión continua. Dichas infusiones continuas pueden llevarse a cabo por cualquiera de los métodos conocidos en las técnicas médicas, por ejemplo, mediante el uso de una bomba de infusión o por goteo iv.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de fórmula (I)



5

en la que

- PEG es lineal o ramificado y, cuando q es 2-8, de múltiples brazos, polietilenglicol;  
 X es O, NH, (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, OC(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, o NHC(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> en la que m = 1-6;  
 L es (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> o (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>, en la que r = 1-10 y p = 1-10;  
 R<sup>1</sup> es CN o SO<sub>2</sub>NR<sup>2</sup>, en el que cada R<sup>2</sup> es independientemente alquilo, arilo, heteroarilo, alquilalqueno, alquilarilo o alquilheteroarilo, cada uno opcionalmente sustituido, o dos R<sup>2</sup> tomados juntos pueden formar un anillo;  
 Y es COR<sup>3</sup> o SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>, en la que R<sup>3</sup> = OH, alcoxi o NR<sup>4</sup>, en la que cada R<sup>4</sup> es independientemente alquilo, alquilo sustituido o dos R<sup>4</sup> tomados juntos puede formar un anillo; y  
 q es 1-8.

15

2. El conjugado de la reivindicación 1 en el que X es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>.

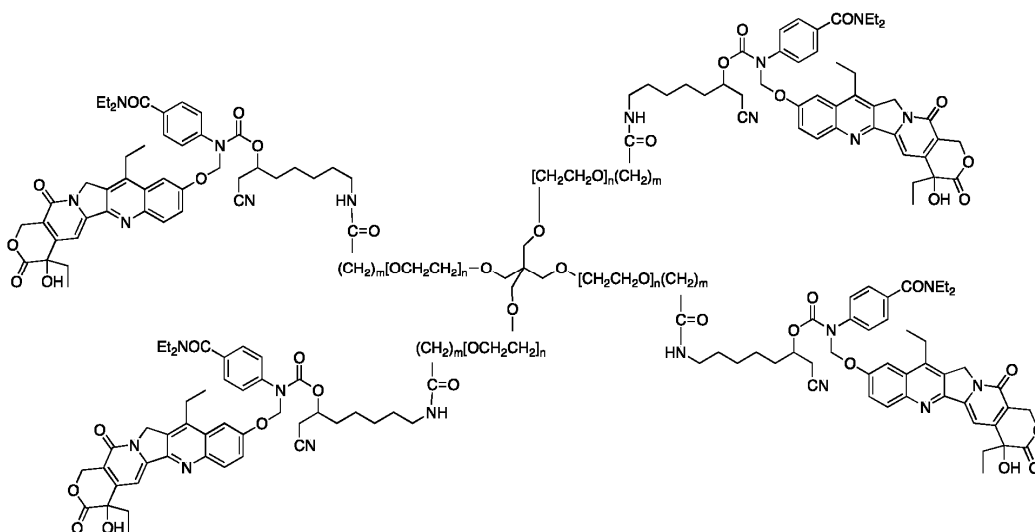
3. El conjugado de la reivindicación 1, en la que el PEG es un polietilenglicol de peso molecular promedio 30.000 - 50.000 Da.

4. El conjugado de la reivindicación 1 en el que q = 4.

5. El conjugado de la reivindicación 1 en el que R<sup>1</sup> = CN.

6. El conjugado de la reivindicación 1, en la que el PEG es polietilenglicol de múltiples brazos de peso molecular promedio 30.000 - 50.000 Da; X es CH<sub>2</sub>; L es (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; R<sup>1</sup> es CN; Y es CONEt<sub>2</sub>; y q = 4.

7. El conjugado de la reivindicación 1 que tiene la fórmula



35

en la que m = 1-6 y n es 200-250.

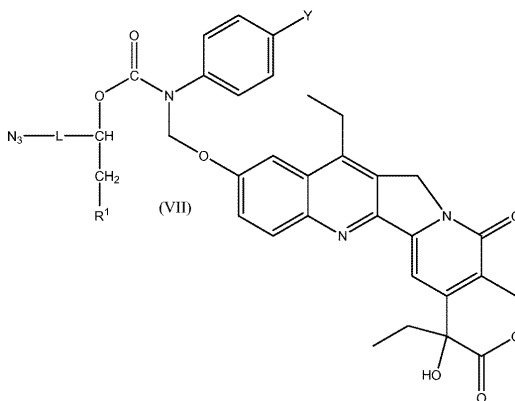
8. El conjugado de la reivindicación 7 en el que m es 1 y n es aproximadamente 225.

9. Una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. La formulación de la reivindicación 9, en la que el pH de la formulación está entre 4,0 y 6,0.

11. Un método para preparar un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) reducir una azida-enlazador-SN-38 de la siguiente fórmula (VII)



para producir un amino-enlazador-SN-38;

(b) poner en contacto el amino-enlazador-SN-38 con un PEG activado para producir un conjugado de la reivindicación 1; y

(c) opcionalmente aislar el conjugado.

12. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en un método para proporcionar exposición a SN-38 continua de baja dosis a un paciente que necesite dicha exposición, comprendiendo dicho método administrar al paciente dicho conjugado.

13. El conjugado para uso de la reivindicación 12, en el que en dicho método la concentración de SN-38 libre se mantiene entre 15 y 5 nM entre administraciones una vez a la semana.

14. El conjugado para uso de la reivindicación 12 en el que la  $C_{m\acute{a}x}/C_{m\acute{i}n}$  observada entre administraciones es menor o igual a 10 entre administraciones una vez a la semana o en la que la  $C_{m\acute{a}x}/C_{m\acute{i}n}$  observada entre administraciones es menor o igual a 5 entre administraciones una vez a la semana .

15. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un método para controlar el nivel de glucurónido de SN-38 en el plasma de un paciente que requiere tratamiento con SN-38, comprendiendo dicho método administrar dicho conjugado a dicho paciente, en el que la relación SN-38G/SN-38 resultante es inferior a 0,2.

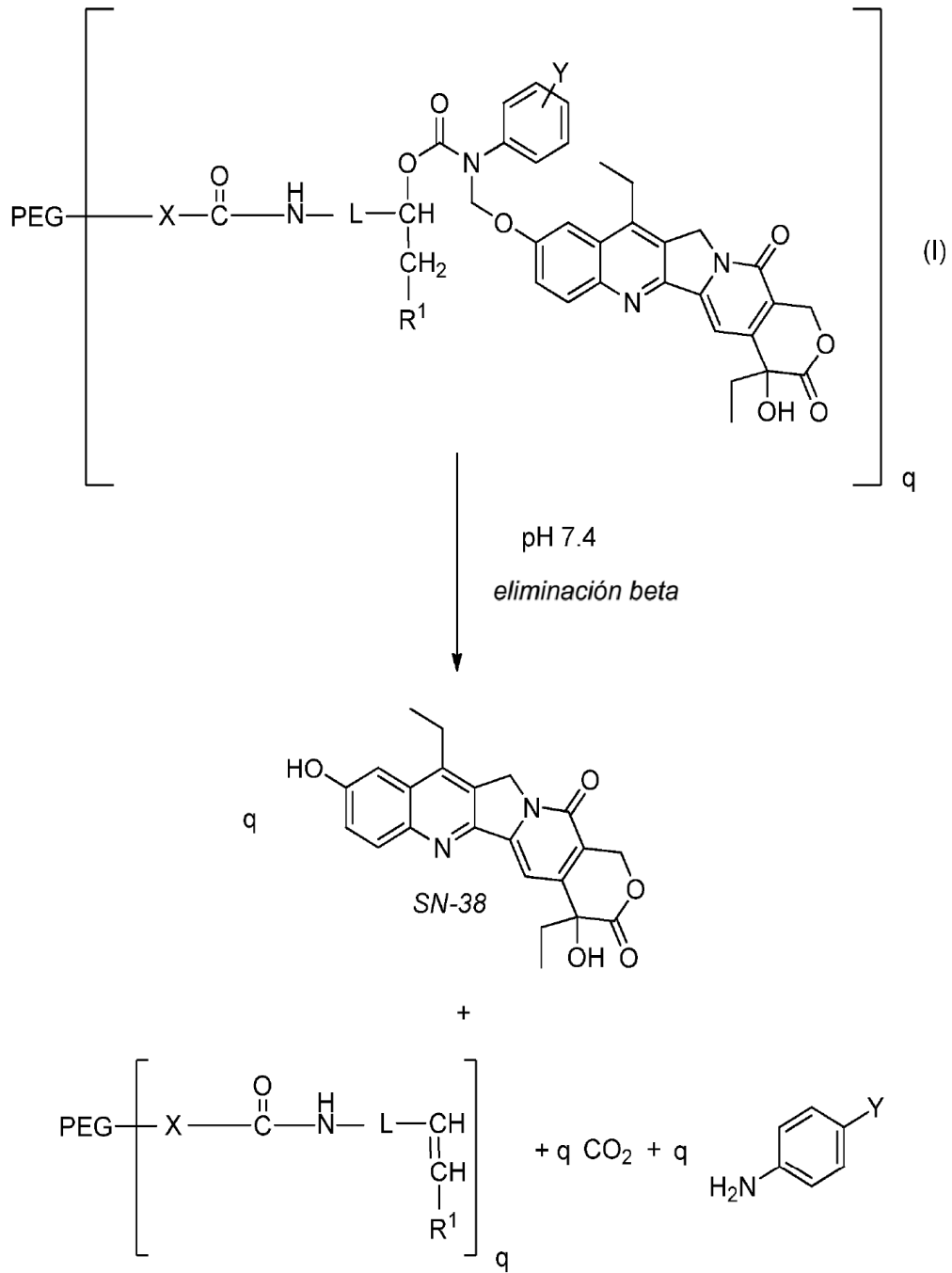


Figura 1

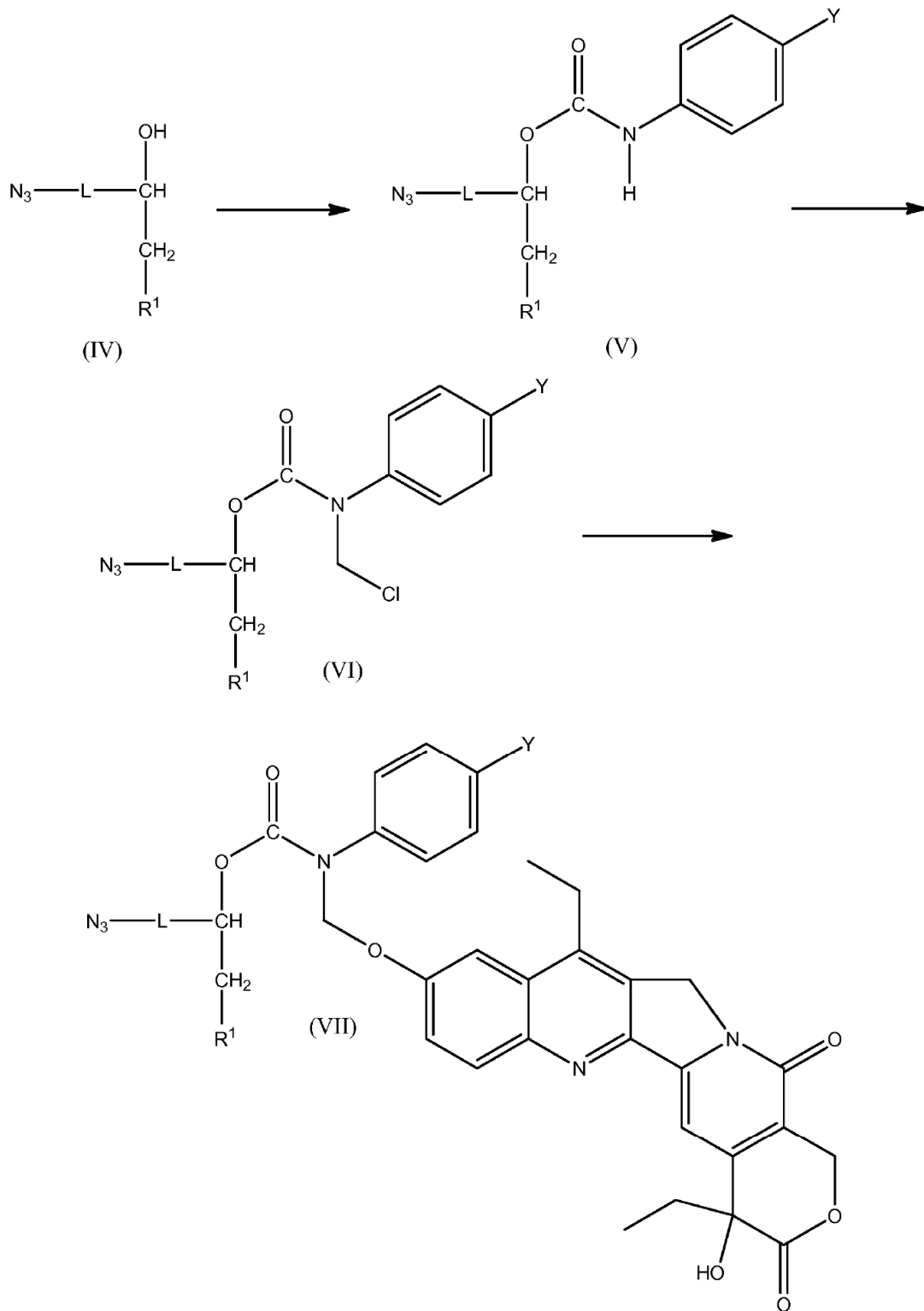


Figura 2

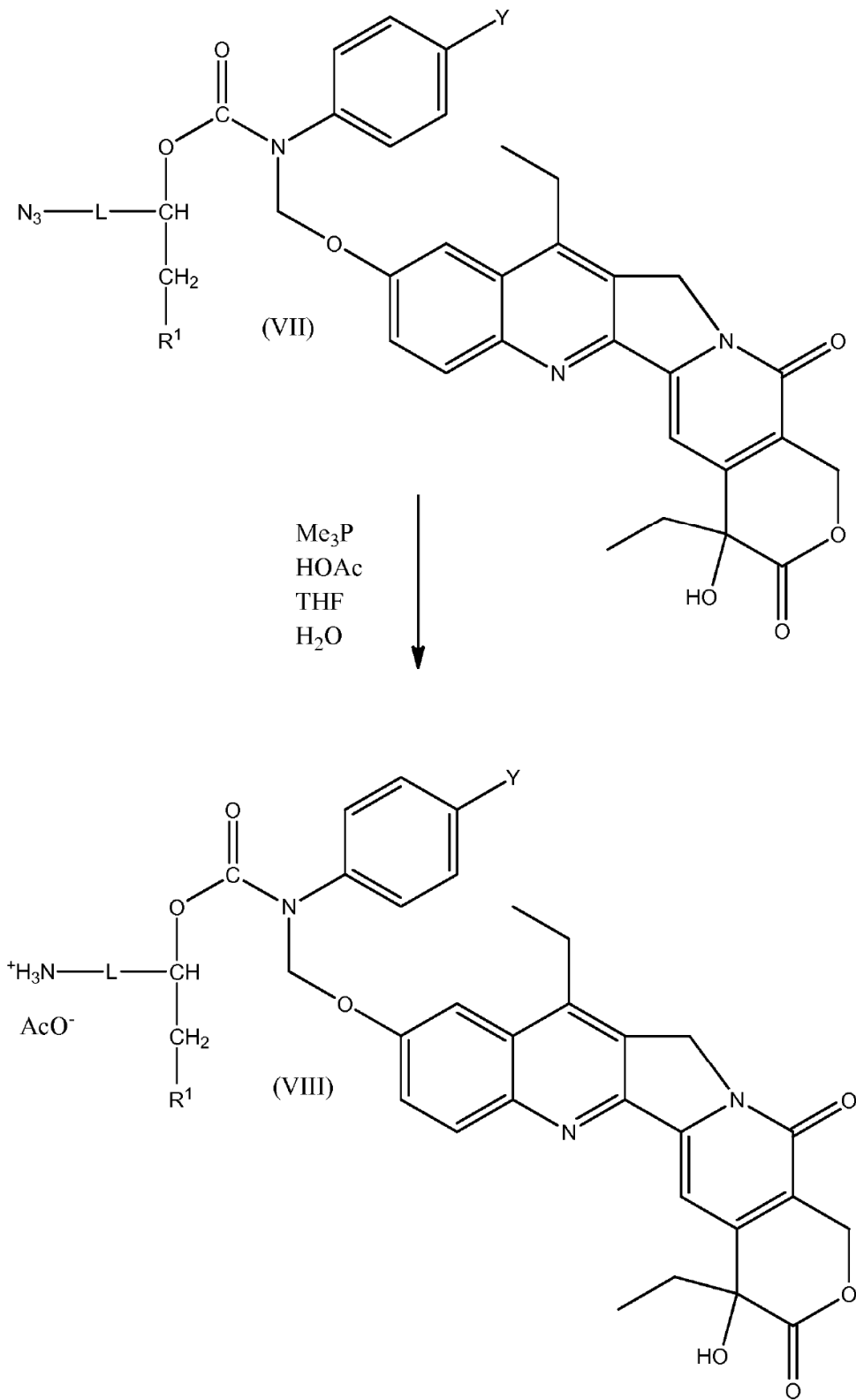
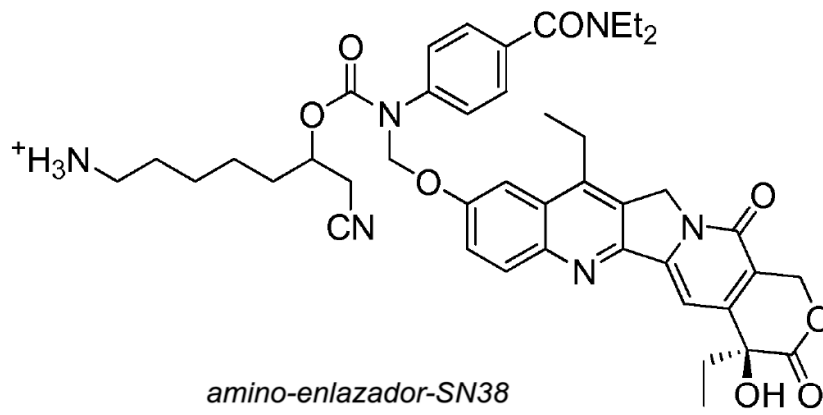
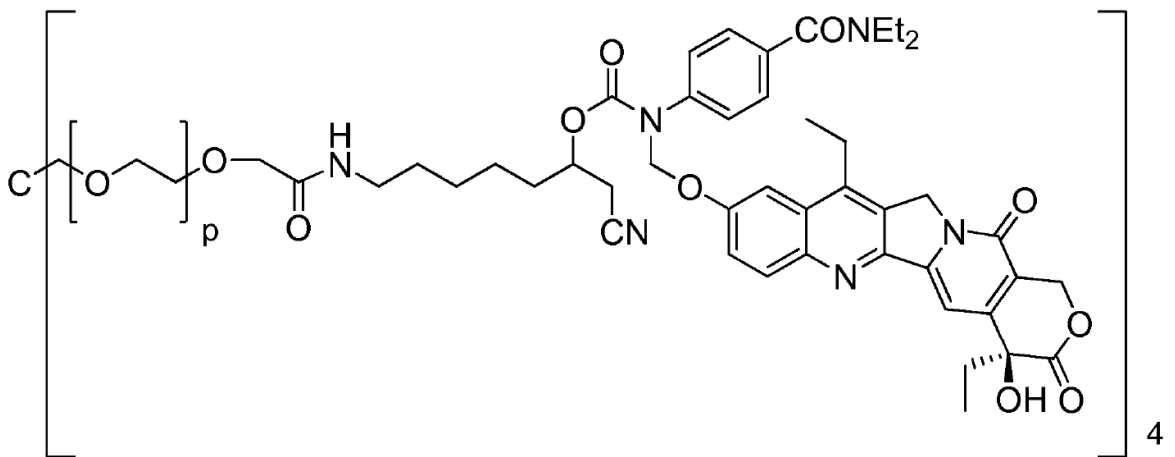


Figura 3



PEG-(X-CO-OSu)<sub>4</sub>

THF, <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>NEt



*conjugado PEG-SN38*

**Figura 4**

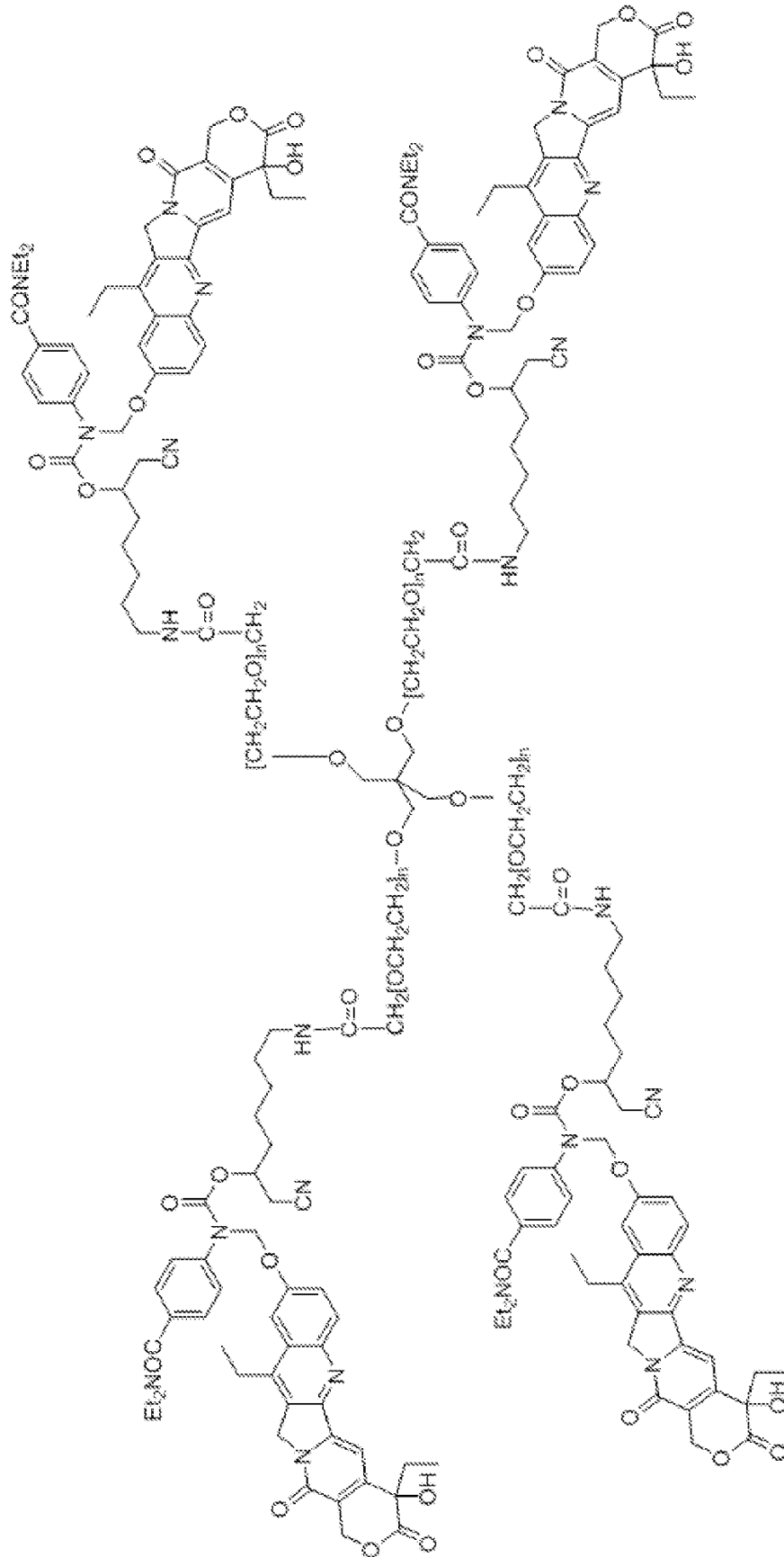


Figure 5



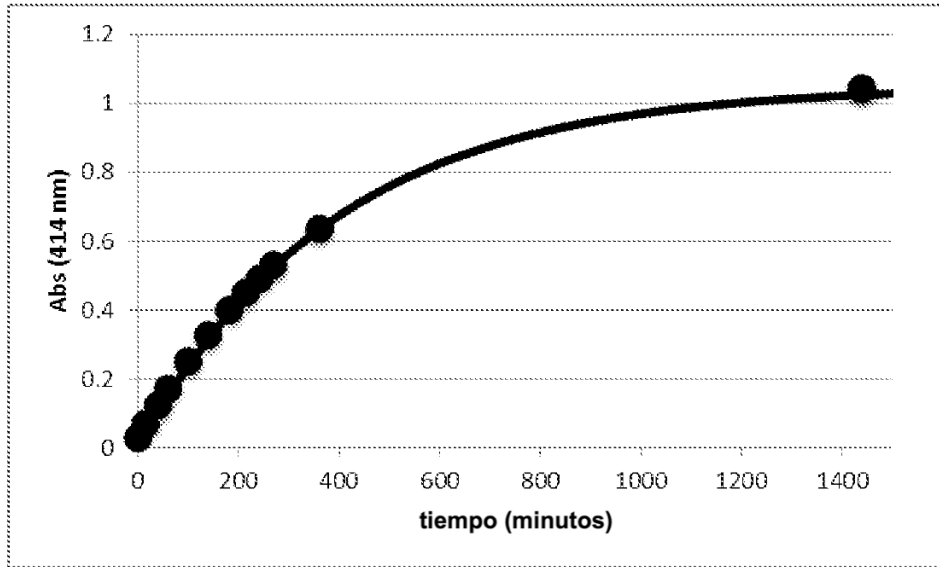


Figura 6

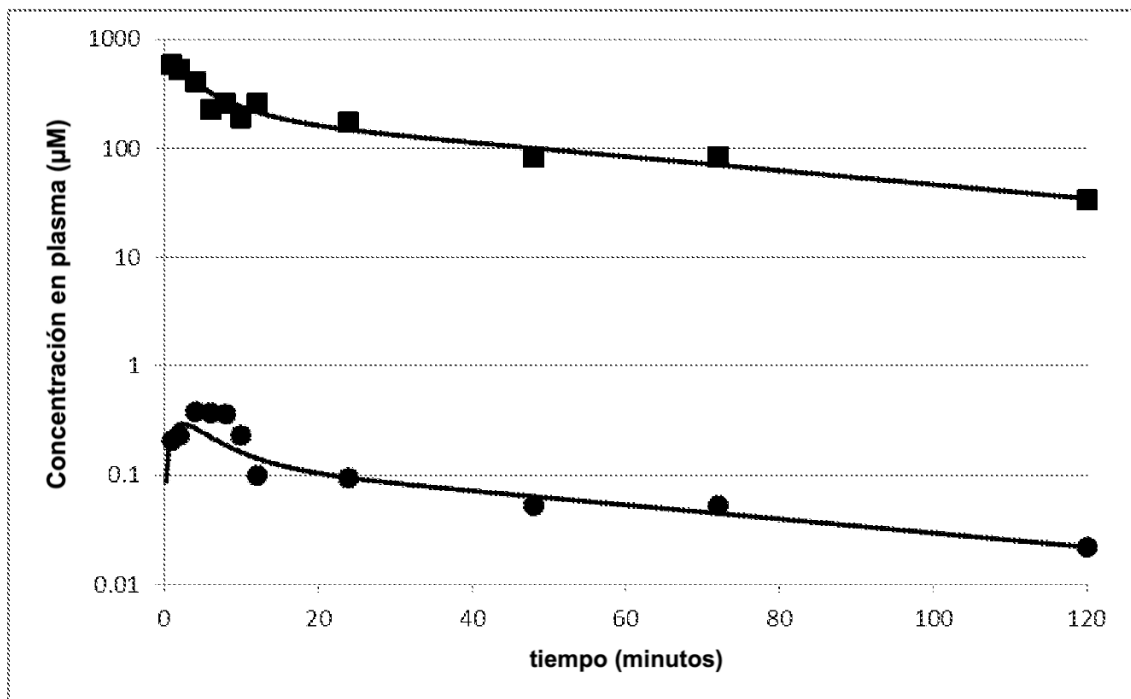


Figura 7

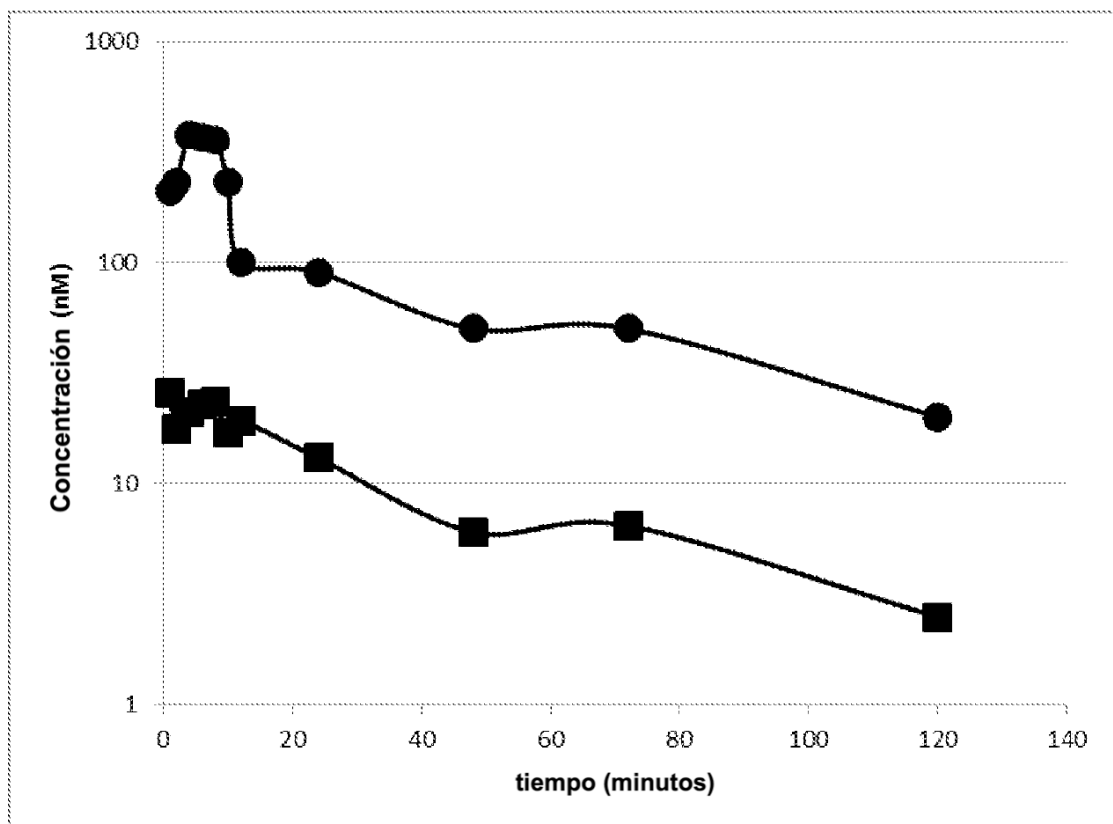


Figura 8