

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 004 351**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2011 E 19173675 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3581206**

(54) Título: **Efectos sinérgicos entre conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina e inhibidores de la ruta PI3K-AKT mTOR**

(30) Prioridad:

22.10.2010 US 40576710 P
23.02.2011 US 201161445785 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2025

(73) Titular/es:

SEAGEN INC. (100.00%)
21823 30th Drive S.E.
Bothell, WA 98021, US

(72) Inventor/es:

LEWIS, TIMOTHY S.;
LAW, CHE-LEUNG y
MCEARCHERN, JULIE A.

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 004 351 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

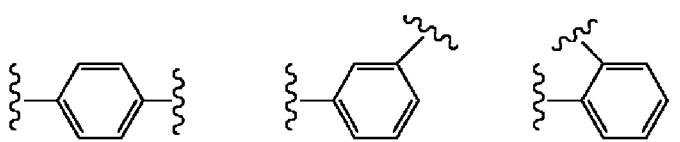
- Efectos sinérgicos entre conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina e inhibidores de la ruta PI3K-AKT-mTOR
- 5 Descripción
Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. Número 61/405,767 presentada el 22 de octubre de 2010 y la Solicitud Provisional de EE. UU. Número 61/445,785 presentada el 23 de febrero de 2011.
- 10 Campo técnico
Se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de cánceres. En particular, las composiciones descritas en el presente documento se basan, en parte, en el descubrimiento de conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina e inhibidores de la ruta PI3K-AKT-mTOR, por ejemplo como se define en las reivindicaciones, actúan sinérgicamente para destruir células tumorales y/o inhibir la proliferación de células tumorales.
- 15 Introducción general
La presente invención proporciona, *entre otras cosas*, composiciones farmacéuticas y sus usos, tal como se define en las reivindicaciones, en el tratamiento de cánceres y, en particular, cánceres que demuestran una regulación positiva de la ruta PI3K-AKT-mTOR. La administración del conjugado de fármaco a base de auristatina y el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR proporcionan un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, la administración del conjugado de fármaco a base de auristatina y el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR proporcionan un efecto sinérgico en la destrucción de células tumorales y/o la inhibición de la proliferación de células tumorales.
- 20 El documento WO2009/048967 A1 describe métodos para el tratamiento del linfoma Hodgkin que comprenden administrar un tratamiento quimioterapéutico y un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco. El documento WO2009/117531 A1 describe compuestos ligadores de fármacos y conjugados de ligando ligadores de fármacos que tienen auristatinas unidas a través del extremo C-terminal. Cheson BD: Current Opinion in Hematology, Rapid Science Publishers, Filadelfia, PA, EE. UU., vol. 16, n.º 4, 1 de julio de 2009, páginas 299-305, describe terapias para los linfomas no Hodgkin de células T periféricas. Johnston et al: Am J Hematol, vol. 85, n.º 5, mayo de 2010, páginas 320-324, describe un ensayo de Fase II del inhibidor de mTOR oral everolimus en el linfoma Hodgkin en recaída. Younes et al: Blood, vol. 112, 2008, página 1006, describe un estudio de escalamiento de dosis de fase I del conjugado anticuerpo-fármaco SGN-35 en pacientes con linfomas CD30 positivos en recaída o refractarios. Jona, A y Younes, A: Blood Rev., vol. 24, n.º 6, 15 de septiembre de 2010 describe estrategias de tratamiento para pacientes con linfoma de Hodgkin clásico recidivante.
- 25 Breve descripción de los dibujos
Las Figuras 1 y 1A muestran los niveles de fosfo-AKT, AKT, fosfo-S6, S6, fosfo-4E-BP1, 4E-BP1, PTEN y B-actina en líneas celulares de cáncer seleccionadas.
- 30 La Figura 2 muestra los índices de combinación (CI) calculados a dosis eficaz 50, a dosis eficaz 75 y a dosis eficaz 90 para h1F6-mcF + temsirolimus, h1F6-mcF + sirolimus, MMAE y temsirolimus y MMAE + sirolimus en la línea celular 786-O (RCC).
- 35 La Figura 3 muestra los CI calculados a dosis eficaz 50, a dosis eficaz 75 y a dosis eficaz 90 para h1F6-mcF + temsirolimus, h1F6-mcF + sirolimus, MMAE + temsirolimus y MMAE + sirolimus en la línea celular Caki-1 (RCC).
- 40 La Figura 4 muestra los CI calculados a dosis eficaz 50, a dosis eficaz 75 y a dosis eficaz 90 para cAC10-vcMMAE + temsirolimus en la línea celular L540cy (HL tipo células T) y para cAC10-vcMMAE + temsirolimus y cAC10-vcMMAE + sirolimus en la línea celular Karpas-299 (ALCL).
- 45 La Figura 5 muestra que cAC10-vcMMAE es sinérgico con temsirolimus en retrasar el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto murino de HL tipo B.
- 50 La Figura 6 muestra que cAC10-vcMMAE es sinérgico con everolimus en retrasar el crecimiento del tumor *in vivo* en un modelo de xenoinjerto murino de HL tipo B.
- 55 La Figura 7 muestra los CI calculados a dosis eficaz 50, a dosis eficaz 75 y a dosis eficaz 90 para hBU12-mcF + temsirolimus y hBU12-mcF + sirolimus en la línea celular HT (NHL).
- 60 La Figura 8 muestra los CI calculados a dosis eficaz 50, a dosis eficaz 75 y a dosis eficaz 90 para h1F6-mcF +

BEZ235 en la línea celular 786-O (RCC), h1F6-mcF + BEZ235 en la línea celular Caki-1 (RCC) cAC10-vcMMAE + BEZ235 en la línea celular L540cy (HL), y hBU12-mcF + BEZ235 en la línea celular HT (NHL).

Definiciones y abreviaturas

- 5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica pertinente a los métodos y composiciones descritos. Como se usa en el presente documento, los siguientes términos y frases tienen los significados que se les asigna, a menos que se especifique lo contrario.
- 10 A menos que se indique lo contrario, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado saturado que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose los átomos de carbono de aproximadamente 1 a aproximadamente 8. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-deciilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, y 3,3-dime-til-2-butilo.
- 15 A menos que se indique lo contrario, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado saturado que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose los átomos de carbono de aproximadamente 1 a aproximadamente 8. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-deciilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, y 3,3-dime-til-2-butilo.
- 20 Los grupos alquilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden denominarse "sustituidos". Un grupo alquilo sustituido es un grupo alquilo que está sustituido con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR'-SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo, y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, y -alquinilo C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o arilo.
- 25 A menos que se indique lo contrario, los términos "alquenilo" y "alquinilo" se refieren a cadenas de carbono lineales y ramificadas que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en ellos), prefiriéndose de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Una cadena de alquenilo tiene al menos un doble enlace en la cadena y una cadena de alquinilo tiene al menos un triple enlace en la cadena. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, etileno o vinilo, alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutileno, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, y -2,3-dimetil-2-butenilo. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, acetilénico, propargilo, acetilenilo, propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo y -3-metil-1 butinilo.
- 30 A igual que con los grupos alquilo, los grupos alquenilo y alquinilo pueden estar sustituidos. Un grupo alquenilo o alquinilo "sustituido" es uno que está sustituido con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo, y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, grupos -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, y -alquinilo C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R"-O(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.
- 35 A menos que se indique lo contrario, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada saturada que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferidos de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y que tienen dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los alquilenos típicos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y similares. Los grupos alquileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, =O, -
- 40 A menos que se indique lo contrario, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada saturada que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferidos de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y que tienen dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los alquilenos típicos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y similares. Los grupos alquileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.
- 45 A menos que se indique lo contrario, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada saturada que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferidos de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y que tienen dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los alquilenos típicos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y similares. Los grupos alquileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.
- 50 A menos que se indique lo contrario, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada saturada que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferidos de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y que tienen dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los alquilenos típicos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y similares. Los grupos alquileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.
- 55 A menos que se indique lo contrario, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada saturada que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferidos de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y que tienen dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los alquilenos típicos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y similares. Los grupos alquileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.

- N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, y -alquinilo C₂-C₈ pueden estar opcionalmente sustituidos además con uno o más sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ y -CN, donde cada R'' se selecciona independientemente de -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.
- 10 A menos que se indique lo contrario, el término "alquenileno" se refiere a un grupo alquieno opcionalmente sustituido que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Grupos alquenileno ejemplares incluyen, por ejemplo, etenileno (-CH=CH-) y propenileno (-CH=CHCH₂-).
- 15 A menos que se indique lo contrario, el término "alquinileno" se refiere a un grupo alquieno opcionalmente sustituido que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinileno ejemplares incluyen, por ejemplo, acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH₂C≡C-), y 4-pentinilo (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-).
- 20 A menos que se indique lo contrario, el término "arilo" se refiere a un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo) derivados de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático parental. Algunos grupos arilo están representados en las estructuras ejemplares como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.
- 25 Un grupo arilo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente de 1 a 5, o incluso de 1 a 2 grupos que incluyen, pero no se limitan a, halógeno, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ y -CN, donde cada R'' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo, y en donde dichos grupos -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈) y -arilo, pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ y -CN, donde cada R'' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.
- 30 A menos que se indique lo contrario, el término "arileno" se refiere a un grupo arilo opcionalmente sustituido que es divalente (es decir, derivado de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo aromático parental) y puede estar en las configuraciones orto, meta o para, como se muestra en las siguientes estructuras con fenilo como grupo arilo ejemplar:
- 35
- 40
- 45 Los grupos "-(alquieno Ci-Cs)arilo", "-(alquenileno C₂-C₈)arilo", y "-(alquinileno C₂-C₈)arilo" típicos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletano-1-ilo y similares.
- 50 A menos que se indique lo contrario, el término "heterociclo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o policíclico que tiene de 3 a 14 átomos en el anillo (también llamados miembros del anillo) en donde al menos un átomo del anillo en al menos un anillo es un heteroátomo seleccionado de N, O, P, o S (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono y heteroátomos en el mismo). El heterociclo puede tener de 1 a 4 heteroátomos del anillo seleccionados independientemente entre N, O, P, o S. Uno o más átomos de N, C, o S en un heterociclo pueden oxidarse. Un heterociclo monocíclico tiene preferiblemente de 3 a 7 miembros de anillo (por ejemplo, de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, P, o S), y un heterociclo bicíclico tiene preferiblemente de 5 a 10 miembros de anillo (por ejemplo, 4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, P, o S). El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos que se indique lo contrario, el heterociclo está unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que da como resultado una estructura estable.
- 55
- 60



Los heterociclos se describen en Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva

York, 1968), particularmente los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta la actualidad), en particular, los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am.Chem. Soc. 82:5566 (1960).

- 5 A menos que se indique lo contrario, el término "heterociclo" se refiere a un grupo heterociclo opcionalmente sustituido como se definió anteriormente que es divalente (*es decir*, derivado de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo heterocíclico parental).
- 10 Los ejemplos de grupos "heterociclo" incluyen a modo de ejemplo y sin limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tianthrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4H-carbazolilo, carbazolilo, β -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, and isatinoilo. Los grupos "heterociclo" preferidos incluyen, pero no se limitan a, benzofuranilo, benzotipenofenilo, indolilo, benzopirazolilo, cumarilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo and tetrazolilo.
- 15 25 Un grupo heterociclo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente de 1 a 2 grupos, que incluye pero no se limita a, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo, y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ y -arilo, pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes incluyendo, pero no limitados a, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R''-C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ y -CN, donde cada R'' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo.
- 30 35

A modo de ejemplo y sin limitación, los heterociclos unidos a carbono pueden unirse en las siguientes posiciones: posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina; posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofuranano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol; posición 2 o 3 de una aziridina; posición 2, 3 o 4 de una azetidina; posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina; o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Aún más normalmente, los heterociclos unidos a carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.

A modo de ejemplo y sin limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno pueden unirse en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina o 1H-indazol; posición 2 de un isoindol, o isoindolina; posición 4 de una morfolina; y la posición 9 de un carbazol, o β -carbolina. Aún más normalmente, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

- 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660

- halógeno), que incluyen, pero no se limitan a, -halógeno, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo, y en donde dichos grupos -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈) y -arilo, pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, o -arilo. Los ejemplos de sustituyentes carbocíclicos monocíclicos incluyen -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -1-ciclopent-1-enilo, -1-ciclopent-2-enilo, -1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, -1-ciclohex-1-enilo, -1-ciclohex-2-enilo, -1-ciclohex-3-enilo, -cicloheptilo, -ciclooctilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, y -ciclooctadienilo.
- Un "carbociclo", ya sea usado solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo carbociclo opcionalmente sustituido como se definió anteriormente que es divalente (es decir, derivado de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo carbocíclico parental).
- A menos que se indique lo contrario por el contexto, un guion (-) designa el punto de unión a la molécula colgante. En consecuencia, el término "-(alquileno C₁-C₈)(arilo)" o "-alquileno C₁-C₈(arilo)" se refiere a un radical alquileno C₁-C₈ como se define en el presente documento en donde el radical alquileno está unido a la molécula colgante en cualquiera de los átomos de carbono del radical alquileno y uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono del radical alquileno se reemplaza por un radical arilo como se define en el presente documento.
- Cuando un grupo particular está "sustituido", ese grupo puede tener uno o más sustituyentes, preferiblemente de uno a cinco sustituyentes, más preferiblemente de uno a tres sustituyentes, lo más preferiblemente de uno a dos sustituyentes, seleccionados independientemente entre la lista de sustituyentes. Sin embargo, el grupo puede tener generalmente cualquier número de sustituyentes seleccionados de halógeno. Los grupos que están sustituidos están así indicados.
- Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en otra parte de esa molécula. Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución en los compuestos descritos en el presente documento pueden ser seleccionados por un experto en la técnica para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, así como los métodos expuestos en el presente documento.
- Los grupos protectores como se usan en el presente documento se refieren a grupos que bloquean de forma selectiva, ya sea temporal o permanentemente, un sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de hidroxi adecuados para uso en los compuestos descritos en el presente documento son farmacéuticamente aceptables y pueden o no necesitar ser escindidos del compuesto parental después de la administración a un sujeto para que el compuesto sea activo. La escisión es a través de procesos metabólicos normales dentro del cuerpo. Los grupos protectores de hidroxi son bien conocidos en la técnica, véanse, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS por T. W. Greene y P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3^a. Edición) e incluyen, por ejemplo, éter (por ejemplo, éteres de alquilo y éteres de sililo que incluyen, por ejemplo, dialquisililéter, trialquisililéter, dialquiltricosililéter), éster, carbonato, carbamatos, sulfonato y grupos protectores de fosfato. Los ejemplos de grupos protectores de hidroxi incluyen, pero no se limitan a, metil éter; metoximetil éter, metiliometil éter, (fenildimethylsilyl) metoximetil éter, bencilogoximetil éter, p-metoxibencilogoximetil éter, p-nitrobencilogoximetil éter, o-nitrobencilogoximetil éter, (4-metoxi-fenoxi) éter, guaiacolmetil éter, t-butoximetil éter, 4-perteniloximetil éter, siloximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, 2,2,2-tricloroetoximetil éter, bis (2-cloroetoxi) metil éter, 2- (trimetilsilil) etoximetil éter, mentoximetil éter, tetrahidropiranil éter, 1-metoxicilcohexil éter, 4-metoxitetrahidropiropiranílico éter, 4-metoxitetrahidropiropiranil éter, S,S-dióxido, 1-[(2-coro-4-metil)fenil] -4-metoxipiperidin-4-il éter, 1- (2-fluorofenil) 4-metoxipiperidin-4-il éter, 1,4-dioxan-2-il éter, tetrahidrofuranyl éter, tetrahidrotifuranil éter; éteres etílicos sustituidos tales como 1-etoxietil éter, 1-(2-cloroetoxi) etil éter, 1- [2-(trimetilsilil)etoxi] etil éter, 1-metil-1-metoxietil éter, 1-metil-1-bencilogoxietil éter, 1-metil-1-bencilogoxi-2-fluoroetil éter, 1-metil-1fenoxietil éter, 2-trimetilsilil éter, t-butil éter, ailil éter, propargil éteres, p-clorofenil éter, p-éter metoxifenílico, éter bencílico, éter p-metoxibencílico, éter 3,4-dimetoxibencílico, éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de tripromilsililo, éter de dimetil isopropilsililo, éter de dietilisopropilsililo, éter de dimetilhexilsilico, éter de t-butil dimetilsililo, éter de difenilmethylsililo, éter de benozilformiato, éster de acetato, éster de dicloroacetato, éster de tricloroacetato, éster de trifluoroacetato, éster de metoxiacetato, éster de trifenilmethoxiacetato, éster de fenilacetato, éster de benzoato, carbonato de alquilmetilo, carbonato de alquil 9-fluorenilmetilo, carbonato de alquiletilo, alquil carbonato de 2,2,2,-tricloroetilo, carbonato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo, alquilsulfonato, metanosulfonato, bencisulfonato, tosilato, metileno acetal, etilideno acetal y t-butilmetylideno cetal. Los grupos protectores preferidos están representados por las fórmulas -R,-Si(R)(R)(R), -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NH(R), -

- 5 S(O)₂R, -S(O)₂OH, P(O)(OH)₂, y -P(O)(OH)OR, en donde R es alquilo C₁-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, -alquileno C₁-C₂₀(carbociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(carbociclo), -alquinileno C₂-C₂₀ (carbociclo), -arilo C₆-C₁₀, -alquileno(arilo) C₁-C₂₀, -alquenileno(arilo) C₂-C₂₀, -alquinileno(arilo) C₂-C₂₀, -alquileno (heterociclo) C₁-C₂₀, -alquinileno(heterociclo) C₂-C₂₀, o -alquinileno(heterociclo) C₂-C₂₀ en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo y heterociclo ya sea solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.
- 10 La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E.
- 15 La abreviatura "cAC10-vcE", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco vc-MMAE (también conocido como mc-vc-MMAE) en donde el anticuerpo es un anticuerpo AC10 quimérico. En una realización ejemplar, el anticuerpo AC10 quimérico tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:1, una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:2, una región constante gamma I humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:11 y una región constante kappa humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:12. Las composiciones de cAC10-vcE ejemplares tienen un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 fármacos por anticuerpo y los fármacos se unen al anticuerpo a través de enlaces tioéter. Brentuximab vedotin es el nombre de USAN para un conjugado cAC10-vcE que se encuentra en ensayos clínicos (Seattle Genetics).
- 20 La abreviatura "h1F6-mcF" se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco mc-MMAF en donde el anticuerpo es un anticuerpo 1F6 humanizado. En una realización ejemplar, el anticuerpo h1F6 tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:5, una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:6, una región constante gamma I humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:11 y una región constante kappa humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:12. Las composiciones de h1F6-mcF ejemplares tienen un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 fármacos por anticuerpo y los fármacos se unen al anticuerpo a través de enlaces tioéter. SGN-75 es un conjugado h1F6-mcF que se encuentra en ensayos clínicos (Seattle Genetics).
- 25 La abreviatura "hBU12-mcF" se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco mc-MMAF en donde el anticuerpo es un anticuerpo BU12 humanizado. En una realización ejemplar, el anticuerpo hBU12 tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:9, una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:10, una región constante gamma I humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:11 y una región constante kappa humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:12. Las composiciones de hBU12-mcF ejemplares tienen un promedio de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 fármacos por anticuerpo y los fármacos se unen al anticuerpo a través de enlaces tioéter. SGN-19A es un conjugado hBU12-mcF que se encuentra en programas preclínicos (Seattle Genetics).
- 30 El término "se une específicamente" significa que el agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo reaccionará, de manera altamente selectiva, con su antígeno correspondiente y no con la multitud de otros antígenos.
- 35 El término "inhibidor" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que tiene la capacidad de inhibir una función biológica de un polipéptido diana. El término "inhibición selectiva" o "inhibición selectivamente" se refiere a la capacidad del agente para reducir preferentemente la actividad de señalización de la diana en comparación con la actividad de señalización fuera de la diana, a través de la interacción directa o indirecta con la diana.
- 40 El término "anticuerpo" se refiere a (a) polipéptidos de inmunoglobulinas y partes inmunológicamente activas de polipéptidos de inmunoglobulinas, es decir, polipéptidos de la familia de inmunoglobulinas, o fragmentos de los mismos, que contienen un sitio de unión al antígeno que se une immunoespecíficamente a un antígeno específico, o (b) derivados sustituidos de manera conservativa de tales polipéptidos de inmunoglobulinas o fragmentos que se unen específicamente al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, dicuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo monocatenario y otros anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. (Véase Holliger y Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.) Las moléculas de inmunoglobulinas pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) o clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En el término inmunoglobulina se incluyen aquellas moléculas de inmunoglobulina que tienen modificaciones en la región constante, incluida la modificación (por ejemplo, sustituciones, delecciones o adiciones) en los residuos de aminoácidos que interactúan con los receptores Fc. Los anticuerpos se describen generalmente, por ejemplo, en Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). A menos que sea evidente a partir del contexto, la referencia a un anticuerpo también incluye derivados.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- 5 Un "derivado de anticuerpo" significa un anticuerpo, como se definió anteriormente, que se modifica por la unión covalente de una molécula heteróloga como, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glicosilación, desglicosilación, acetilación o fosforilación normalmente no asociada al anticuerpo, y similares.
- 10 Los anticuerpos empleados en los métodos y composiciones de descritos en el presente documento son preferiblemente monoclonales, y pueden ser anticuerpos multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y fragmentos de unión de cualquiera de los anteriores, siempre que puedan conjugarse con un fármaco de auristatina directa o indirectamente a través de un ligador.
- 15 El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único determinante antigenico, también denominado epítopo. El modificador "monoclonal" es indicativo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos al epítopo idéntico y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante cualquier técnica o metodología conocida en la técnica; por ejemplo, el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., 1975, Nature 256:495, o los métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 4.816.567). En otro ejemplo, los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos, usando las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, Nature 352:624-628, y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597. En contraste, los anticuerpos en una preparación de anticuerpos policlonales son normalmente una población heterogénea de isótipos y/o clases de inmunoglobulinas y también muestran una variedad de especificidad de epítopo.
- 20
- 25
- 30 "Efecto citotóxico", en referencia al efecto de un agente en una célula, significa la muerte de la célula. "Efecto citostático" significa una inhibición de la proliferación celular. Un "agente citotóxico" significa un agente que tiene un efecto citotóxico en una célula, agotando o inhibiendo así el crecimiento, respectivamente, de las células en una población celular.
- 35 El término "sujeto" o "paciente" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal, en particular un animal clasificado como mamífero, incluidos los humanos, los animales domésticos y de granja, y los animales del zoológico, deportivos o mascotas, como perros, caballos, gatos, vacas, y similares. Preferiblemente, el sujeto es humano.
- 40 Los términos "tratamiento" y "terapia", y similares, como se usan en el presente documento, se refieren a ralentizar, detener o revertir la progresión del cáncer en un sujeto. El tratamiento se puede evidenciar por la inhibición del crecimiento tumoral, la detención del crecimiento tumoral, la regresión de tumores ya existentes o el aumento de la supervivencia.
- 45
- 50 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de uno o más agentes o composiciones como se describe en el presente documento que es suficiente para retardar, detener o revertir la progresión del cáncer en un sujeto o aumentar la supervivencia del paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a una concentración de suero diana que se ha demostrado que es eficaz, por ejemplo, en la disminución de la progresión de la enfermedad. Cuando el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa para referirse a la terapia de combinación, se refiere a la cantidad de la combinación de agentes tomados en conjunto para que el efecto combinado provoque la respuesta biológica o medicinal deseada. La eficacia se puede medir de manera convencional, dependiendo de la afección a tratar. Por ejemplo, en enfermedades neoplásicas, la eficacia puede medirse evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), o determinando las tasas de respuesta (RR).
- 55
- 60 El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los EE. UU., u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra un agente o composición.
- 65 Conjugado anticuerpo-fármaco
- La invención descrita en el presente documento abarca conjugados de anticuerpo-fármaco en terapia de combinación, como se define en las reivindicaciones, para uso en el tratamiento del cáncer. Los conjugados anticuerpo-fármaco comprenden un anticuerpo como unidad de ligando y una auristatina seleccionada de MMAE y MMAF como unidad de fármaco. El anticuerpo es uno que se une específicamente a un antígeno de una célula cancerosa que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa como se define en las reivindicaciones. Los

conjugados anticuerpo-fármaco tienen una potente actividad citotóxica y/o citostática contra las células que expresan el antígeno de las células cancerosas a las que se une específicamente el anticuerpo. Las unidades de fármaco están unidas covalentemente al anticuerpo a través de una unidad ligadora (-LU-).

- 5 En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco tiene la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en donde

10 L es la unidad de ligando y es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una célula cancerosa que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa como se define en las reivindicaciones,

15 (LU-D) es un resto unidad ligadora-unidad de fármaco, en donde:

15 LU- es una unidad ligadora, y

20 -D es un fármaco de auristatina seleccionado de MMAE y MMAF que tiene actividad citostática o citotóxica contra una célula diana; y

20 p es de 1 a 20.

En algunas realizaciones, p varía de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 o de 1 a 2. En algunas realizaciones, p varía de 2 a 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En otras realizaciones, p es 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

- En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco tiene la siguiente fórmula:



30 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde:

35 L es la unidad de ligando y es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una célula cancerosa que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa como se define en las reivindicaciones,

35 -A_a-W_w-Y_y- es una unidad ligadora (LU), en donde:

40 -A- es una unidad tensora,

40 a es 0 o 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,

45 w es un número entero que varía entre 0 y 12,

45 -Y- es una unidad espaciadora (por ejemplo, una unidad espaciadora autoinmolativa),

y es 0, 1 o 2;

50 -D es una unidad de fármaco de auristatina seleccionada de MMAE y MMAF que tiene actividad citostática o citotóxica contra la célula diana; y

50 p es de 1 a 20.

55 En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1, e y es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1, e y es 0 o 1. En algunas realizaciones, p varía de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2. En algunas realizaciones, p varía de 2 a 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En otras realizaciones, p es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones, cuando w no es cero, y es 1 o 2. En algunas realizaciones, cuando w es de 1 a 12, y es 1 o 2. En algunas realizaciones, w es de 2 a 12 e y es 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 1 y w e y son 0.

65 En composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados anticuerpo-fármaco, p es el número promedio de moléculas de fármaco por ligando, también denominado carga promedio de fármaco. La carga promedio de fármaco puede variar de 1 a aproximadamente 20 fármacos(D) por ligando. En algunas realizaciones, cuando p representa la carga promedio de fármaco, p es aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 o aproximadamente 6. En realizaciones preferidas, cuando p representa

- la carga de fármaco promedio, p es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. El número promedio de fármacos por ligando en la preparación de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de los conjugados de anticuerpo-fármaco en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco homogéneos donde p es un valor determinado de conjugados de anticuerpo-fármaco con otras cargas de fármaco puede lograrse a través de medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. En realizaciones ejemplares, p es de 2 a aproximadamente 8.
- 10 La generación de conjugados anticuerpo-fármaco se puede lograr mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, los conjugados anticuerpo-fármaco comprenden un anticuerpo como la unidad de ligando, un fármaco y, opcionalmente, un ligador que se une al fármaco y al agente de unión. Se encuentran disponibles varias reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos y/ligadores a anticuerpos. Esto se logra a menudo mediante la reacción de los residuos de aminoácidos de la molécula de anticuerpo, que incluyen los grupos amina de la lisina, los grupos ácido carboxílico libres del ácido glutámico y ácido aspártico, los grupos sulfhidrilo de la cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos no específicos más utilizados de unión covalente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Además, se han utilizado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo. También disponible para la unión de fármacos a agentes aglutinantes es la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación periódica de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxi, formando así un aldehído que luego reacciona con el agente de unión. La unión se produce a través de la formación de una base de Schiff con grupos amino del agente de unión. Los isotiocianatos también se pueden usar como agentes de acoplamiento para unir covalentemente fármacos a agentes aglutinantes. Otras técnicas son conocidas por los expertos en la técnica.
- 15 20 25
- En ciertas realizaciones, un intermedio, que es el precursor del ligador, se hace reaccionar con el fármaco en condiciones apropiadas. En ciertas realizaciones, los grupos reactivos se utilizan en el fármaco y/o el intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermediario, o el fármaco derivado, se hace reaccionar posteriormente con el anticuerpo bajo condiciones apropiadas.
- 30
- Unidades ligadoras**
- 35 Normalmente, los conjugados anticuerpo-fármaco comprenden una región ligadora entre la unidad de fármaco y la unidad de ligando. En algunas realizaciones, el ligador es escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del ligador libera la unidad de fármaco del ligando en el entorno intracelular. En otras realizaciones más, la unidad ligadora no es escindible y el fármaco se libera, por ejemplo, por degradación de anticuerpos.
- 40 En algunas realizaciones, el ligador es escindible por un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El ligador puede ser, por ejemplo, un ligador de peptidilo que se escinde por una peptidasa intracelular o enzima proteasa, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas realizaciones, el ligador de peptidilo es al menos dos aminoácidos de largo o al menos tres aminoácidos de largo. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todos los cuales se sabe que escinden derivados de fármacos dipéptidos que dan como resultado la liberación de un fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Los más típicos son los ligadores de peptidilo que son escindibles por las enzimas que están presentes en las células cancerosas diana. Por ejemplo, se puede usar un ligador de peptidilo que se puede escindir por la proteasa dependiente de tiol catepsina-B, que se expresa altamente en tejido canceroso (por ejemplo, un ligador Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly). Otros ejemplos de dichos ligadores se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 6.214.345 o la Patente de EE. UU. N.º 7.659.241. En una realización específica, el ligador peptidilo que se puede escindir por una proteasa intracelular es un ligador Val-Cit o un ligador Phe-Lys (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el ligador val-cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa normalmente cuando está conjugado y las estabilidades en suero de los conjugados son normalmente altas.
- 45 50 55
- En aún otras realizaciones, el ligador se puede escindir bajo condiciones reductoras (por ejemplo, un ligador disulfuro). Una variedad de ligadores disulfuro son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (CW Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la Patente de EE. UU. N.º 4.880.935.)
- 60 65
- En otras realizaciones específicas, el ligador es un ligador de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), un ligador de maleimidobenzoilo (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304), o un análogo

de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

En otras realizaciones más, la unidad ligadora no se puede escindir y el fármaco se libera por degradación del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.498.298).

5 En un aspecto, el ligador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se usa en el presente documento, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un ligador, significa que no más de aproximadamente el 20 %, normalmente no más de aproximadamente el 15 %, más normalmente no más de 10 %, e incluso más por lo general, no más de aproximadamente el 5 %, no más de 15 aproximadamente el 3 %, o no más de aproximadamente el 1 % de los ligadores, en una muestra de conjugado anticuerpo-fármaco, se escinden cuando el conjugado anticuerpo-fármaco se presenta en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Si un ligador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular se puede determinar, por ejemplo, incubando con plasma el conjugado anticuerpo-fármaco durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16, o 24 horas) y después cuantificando la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

10 En otras realizaciones no excluyentes entre sí, el ligador promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el ligador promueve la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (*es decir*, en el medio del ligador-agente terapéutico del conjugado anticuerpo-fármaco como se describe en el presente documento). En otras realizaciones más, el ligador promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el compuesto de auristatina como con el anticuerpo.

15 La síntesis y la estructura de unidades ligadoras, unidades extensoras, unidades de aminoácidos, unidades espaciadoras autoinmolativas y unidades de fármacos de ejemplo que se pueden usar con las presentes composiciones y métodos se describen en el documento WO 2004010957, Publicación de EE. UU. N.º 20060074008, Publicación de EE. UU. N.º 20050238649, Publicación de EE. UU. N.º 20060024317, y Publicación de EE. UU. N.º 20090010945.

20 Una "unidad ligadora" (LU) es un compuesto bifuncional que se puede usar para unir una unidad de fármaco y una unidad de ligando para formar un conjugado anticuerpo-fármaco. En algunas realizaciones, la unidad ligadora tiene la fórmula:



25 35 en donde: -A- es una unidad extensora,

a es 0 o 1,

40 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,

w es un número entero que varía entre 0 y 12,

-Y- es una unidad espaciadora (por ejemplo, una unidad espaciadora autoinmolativa), y

45 y es 0, 1 o 2.

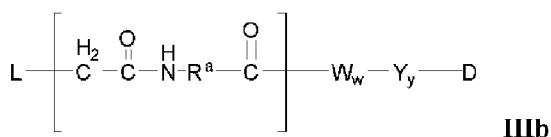
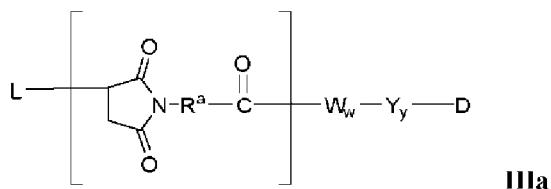
50 En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1 e y es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 0 o 1 e y es 0 o 1. En algunas realizaciones, cuando w es de 1 a 12, y es 1 o 2. En algunas realizaciones, w es de 2 a 12 e y es 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 1 y w e y son 0.

55 La unidad extensora

60 65 La unidad extensora (A), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de ligando (por ejemplo, un anticuerpo) a una unidad de aminoácido (-W-), si está presente, a una unidad espaciadora (-Y-), si está presente; o a una unidad de fármaco (-D). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo tanto de forma natural como mediante manipulación química incluyen, pero no se limitan a, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. En un ejemplo, los grupos sulfhidrilo pueden generarse por reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un anticuerpo. En otra realización, los grupos sulfhidrilo pueden generarse por reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un anticuerpo con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos generadores de sulfhidrilo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante y está diseñado para transportar una o más lisinas. En ciertas otras realizaciones, el anticuerpo recombinante está diseñado para llevar grupos sulfhidrilo adicionales, por ejemplo, cisteínas adicionales.

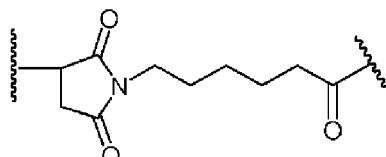
65 En una realización, la unidad extensora forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de ligando. El átomo de azufre se puede derivar de un grupo sulfhidrilo de un ligando. Las unidades extensoras representativas de esta

- realización se representan dentro de los corchetes de las fórmulas IIIa y IIIb, en donde L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definieron anteriormente, y R^a se selecciona entre -alquieno C₁-C₁₀-, -alquenileno C₂-C₁₀-, -alquinileno C₂-C₁₀-, -carbociclo-, -O-(alquieno C₁-C₈)-, O-(alquenileno C₂-C₈)-, -O-(alquinileno C₂-C₈)-, -arileno-, -alquieno C₁-C₁₀-arileno-, -alquenileno C₂-C₁₀-arileno-, -alquinileno C₂-C₁₀-arileno-, -arileno-alquieno C₁-C₁₀-, -arileno-alquenileno C₂-C₁₀-, -arileno-alquinileno C₂-C₁₀-, -alquieno C₁-C₁₀-(carbociclo)-, -alquenileno C₂-C₁₀-(carbociclo)-, -alquinileno C₂-C₁₀-(carbociclo)-, -(carbociclo)-alquieno C₁-C₁₀-, -(carbociclo)-alquenileno C₂-C₁₀-, -(carbociclo)-alquinileno C₂-C₁₀-(heterociclo)-, -(heterociclo)-alquieno C₁-C₁₀-, -(heterociclo)-alquenileno C₂-C₁₀-, -(heterociclo)-alquinileno C₂-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r-, o - (CH₂CH₂O)_r-CH₂-, y r es un número entero que varía entre 1-10, en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, carbociclo, heterociclo y arileno, ya sean solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, carbociclo, heterociclo y arileno, ya sean solos o como parte de otro grupo, no están sustituidos. En algunas realizaciones, R^a se selecciona entre -alquieno C₁-C₁₀-, -carbociclo-, -O-(alquieno C₁-C₈)-, -arileno-, -alquieno C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquieno C₁-C₁₀-, -alquieno C₁-C₁₀-(carbociclo)-, -(carbociclo)-alquieno C₁-C₁₀-, -(carbociclo)-alquenileno C₂-C₁₀-, -(carbociclo)-alquinileno C₂-C₁₀-(heterociclo)-, -(heterociclo)-alquieno C₁-C₁₀-, -(heterociclo)-alquenileno C₂-C₁₀-, -(heterociclo)-alquinileno C₂-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r-, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, y r es un número entero que varía entre 1-10, en donde dichos grupos alquieno no están sustituidos y el resto de los grupos están opcionalmente sustituidos.
- Debe entenderse a partir de todas las realizaciones ejemplares que, incluso cuando no se denotan expresamente, de 1 a 20 restos de fármaco o restos de ligador de fármaco pueden unirse a un ligando (p = 1-20).



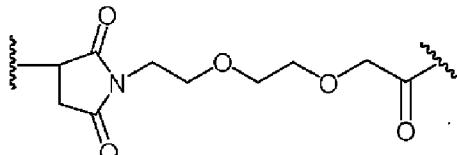
25

Una unidad extensora ilustrativa es la de Fórmula IIIa en donde R^a es -(CH₂)₅-:



30

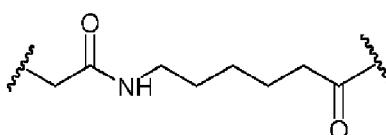
Otra unidad extensora ilustrativa es la de Fórmula IIIa en donde R^a es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es 2:



35

Una unidad extensora ilustrativa es la de Fórmula IIIa en donde R^a es -arileno- o -arileno-alquieno C₁.C₁₀. En algunas realizaciones, el grupo arilo es un grupo fenilo no sustituido.

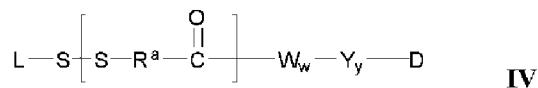
Otra unidad extensora ilustrativa es la de la fórmula IIIb en donde R^a es -(CH₂)₅-:



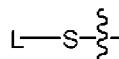
40

En ciertas realizaciones, la unidad extensora está unida a la unidad de ligando a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de ligando y un átomo de azufre de la unidad extensora. Una unidad extensora representativa de esta realización se representa dentro de los corchetes de la Fórmula IV, en donde R^a,

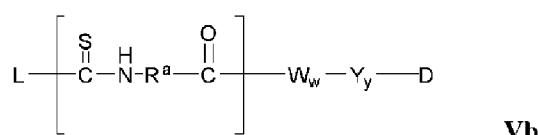
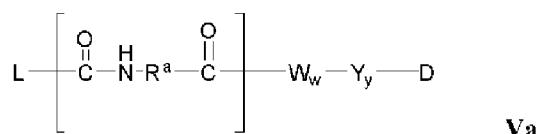
L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.



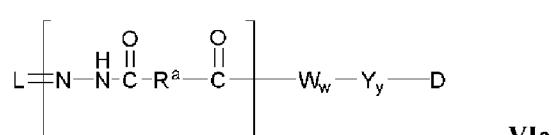
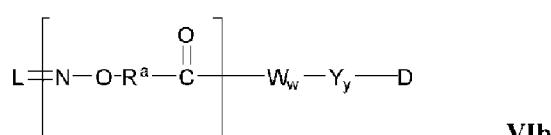
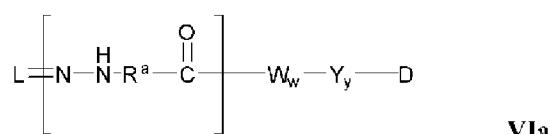
- 5 Debe observarse que a lo largo de esta solicitud, el resto S en la fórmula a continuación se refiere a un átomo de azufre de la unidad de ligando, a menos que el contexto indique lo contrario.



- 10 En otras realizaciones más, el extensor, antes de unirse a L, contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario del ligando. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero no se limitan a, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4 nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades extensoras representativas de esta realización se representan entre los corchetes de las Fórmulas Va y Vb, en donde -R^a-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definen anteriormente;



- 20 En algunas realizaciones, el extensor contiene un sitio reactivo que es reactivo a un grupo carbohidrato (-CHO) modificado que puede estar presente en un ligando. Por ejemplo, un carbohidrato se puede oxidar ligeramente usando un reactivo como el peryodato de sodio y la unidad resultante (-CHO) del carbohidrato oxidado se puede condensar con un extensor que contiene una funcionalidad tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina y una arilhidrazida tales como las descritas por Kaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem.2:133-41 Las unidades extensoras representativas de esta realización se representan entre los corchetes de las Fórmulas VIa, VIb y VIc en donde -R^a-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se definen anteriormente.

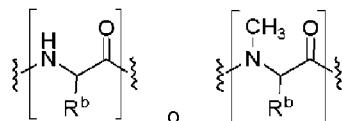


- 35 La unidad de aminoácido

- La unidad de aminoácido (-W-), cuando está presente, une la unidad extensora a la unidad espaciadora si la unidad espaciadora está presente, une la unidad extensora al resto de fármaco si la unidad espaciadora está ausente, y une la unidad de ligando a la unidad de fármaco si la unidad extensora y la unidad espaciadora están ausentes.

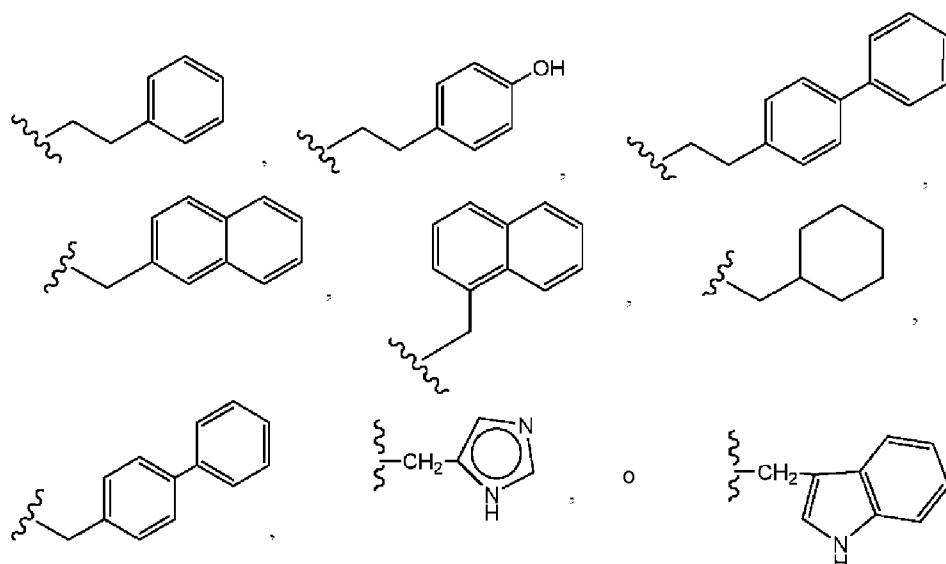
W_w puede ser, por ejemplo, un monopéptido, dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- independientemente tiene la fórmula indicada a continuación en los corchetes, y w es un número entero que varía

de 0 a 12:



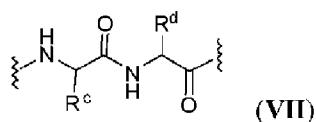
- 5 en donde R^b es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{=NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(\text{=NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,

10



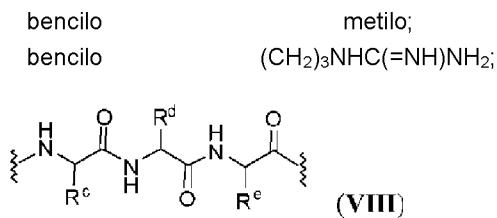
- 15 En algunas realizaciones, la unidad de aminoácido se puede escindir enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada al cáncer o a un tumor, para liberar la unidad de fármaco ($-\text{D}$), la cual en una realización está protonada *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D).

- 20 En ciertas realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad de aminoácidos puede comprender aminoácidos no naturales. Las unidades ilustrativas de W_w están representadas por las fórmulas (VII)-(IX):



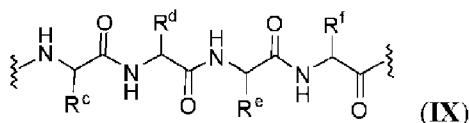
- 25 en donde R^c y R^d son como sigue:

R^c	R^d
Bencilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
metilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
isopropilo	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
isopropilo	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
bencilo	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
isobutilo	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
sec-butilo	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;



en donde R^c , R^d y R^e son como sigue:

R^c	R^d	R^e
bencilo	Bencilo	$(CH_2)_4NH_2;$
isopropilo	Bencilo	$(CH_2)_4NH_2;$ y
H	Bencilo	$(CH_2)_4NH_2;$



en donde R^c , R^d , R^e y R^f son como sigue:

R ^c	R ^d	R ^e	R ^f
H	bencilo	isobutilo	H; y
metilo	isobutilo	metilo	isobutilo

Las unidades de aminoácido ejemplares incluyen, por ejemplo, unidades de fórmula VII donde: R^c es bencilo y R^d es -(CH₂)₄NH₂; R^c es isopropilo y R^d es -(CH₂)₄NH₂; o R^c es isopropilo y R^d es -(CH₂)₃NHCONH₂. Otra unidad de aminoácido ejemplar es una unidad de fórmula VIII en donde R^c es bencilo, R^d es bencilo y R^e es -(CH₂)₄NH₂.

Las unidades $-W_w-$ útiles se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática por una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor. En una realización, una unidad $-W_w-$ es aquella cuya escisión se cataliza por la catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

20 En una realización, $-W_w-$ es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Cuando R^b , R^c , R^d , R^e o R^f es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que R^b , R^c , R^d , R^e o R^f está unido es quiral.

Cada átomo de carbono al que R^b, R^c, R^d, R^e o R^f está unido está independientemente en la configuración (S) o (R).

25 En un aspecto de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es la valina-citrulina (vc o val-cit). En otro aspecto, la unidad de aminoácidos es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro aspecto más de la unidad de aminoácidos, la unidad de aminoácidos es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la unidad de aminoácidos es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolincarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido 30 isonepecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isopicótico.

La unidad espaciadora

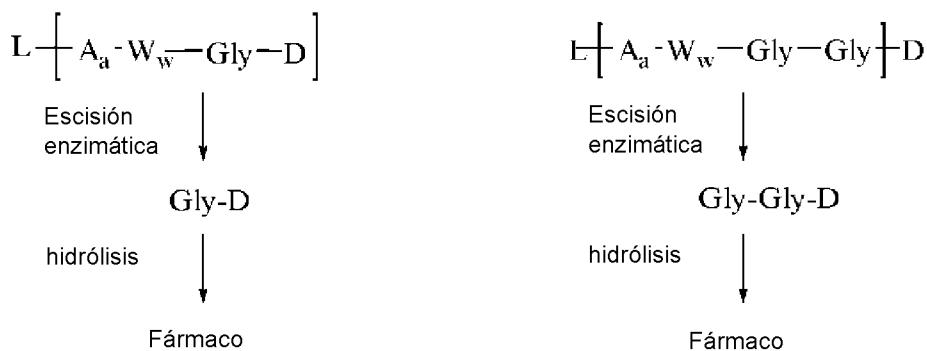
35 La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de aminoácido a la unidad de fármaco cuando una unidad de aminoácido está presente. Alternativamente, la unidad espaciadora une la unidad extensora a la unidad de fármaco cuando la unidad de aminoácidos está ausente. La unidad espaciadora también une la unidad de fármaco a la unidad de ligando cuando tanto la unidad de aminoácidos como la unidad extensora están ausentes.

40 Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: no autoinmolativas o autoinmolativas. Una unidad espaciadora no autoinmolativa es una en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida al resto de fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado anticuerpo-fármaco. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autoinmolativa incluyen, pero no se limitan a una unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina (ambas representadas en el Esquema 1) (infra). Cuando un conjugado que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina experimenta una escisión enzimática a través de una enzima (por ejemplo, una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos), un resto glicina-

45

glicina-fármaco o un resto de glicina-fármaco se escinden de L-Aa-Ww-. En una realización, tiene lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana, escindiendo el enlace del resto glicina-fármaco y liberando el fármaco.

Esquema 1



5

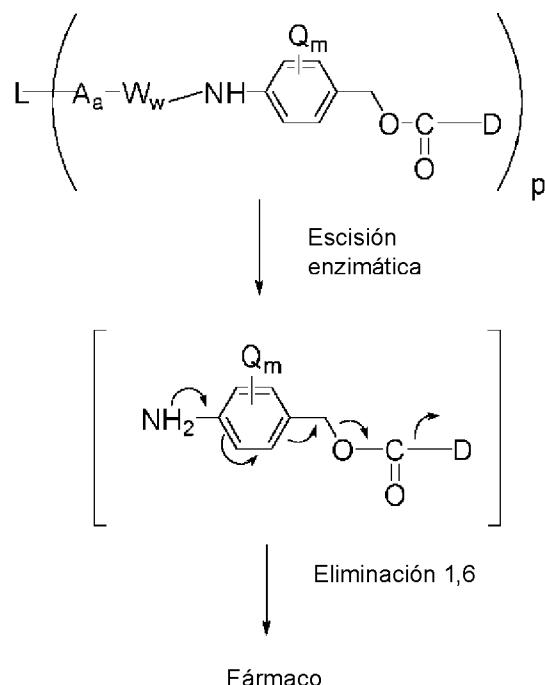
En algunas realizaciones, una unidad espaciadora no autoinmolativa (-Y-) es -Gly-. En algunas realizaciones, una unidad espaciadora no autoinmolativa (-Y-) es -Gly-Gly-.

- 10 En una realización, se proporciona un conjugado de fármaco-espaciador el que la unidad espaciadora está ausente ($y=0$), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Alternativamente, un conjugado que contiene una unidad espaciadora autoinmolativa puede liberar -D. Como se usa en el presente documento, el término "espaciador autoinmolativo" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente dos restos químicos separados en una molécula tripartita estable. Se separará espontáneamente del segundo resto químico si su enlace con el primer resto se escinde.

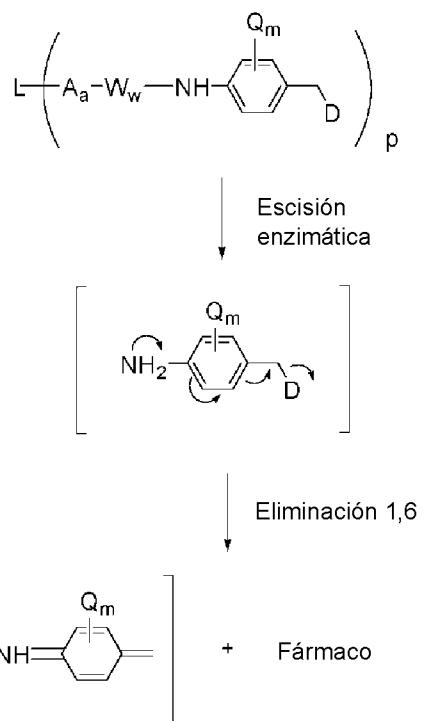
- 20 En algunas realizaciones, $-Y_y-$ es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3) cuya porción de fenileno está sustituida con Q_m en donde Q es- alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, - nitrógeno o -ciano; y m es un número entero que varía entre 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

- 25 En algunas realizaciones, -Y- es un grupo PAB que está unido a -W_w- a través del átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y está conectado directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin estar vinculado por ninguna teoría o mecanismo en particular, el Esquema 2 representa un posible mecanismo de liberación de fármaco de un grupo PAB que se une directamente a -D a través de un grupo carbamato o carbonato como lo describe Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872.

Esquema 2

En el Esquema 2, Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, -nitró o -ciano; m es un número entero que varía entre 0-4; y p varía desde 1 hasta 5 aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

Sin estar vinculado por ninguna teoría o mecanismo en particular, el Esquema 3 representa un posible mecanismo de liberación del fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a -D a través de un enlace éter o amina, 10 en donde D incluye el grupo oxígeno o nitrógeno que es parte de la unidad de fármaco.

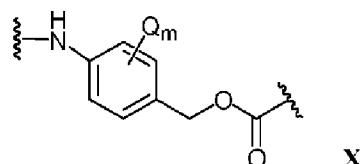
Esquema 3

En el Esquema 3, Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, -nitró o -ciano; m es un número entero que varía entre 0-4; y p varía desde 1 hasta 5 aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

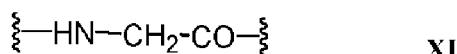
Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB como los derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al., 1999, 10 Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y otro o para-aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que se someten a una ciclación con la hidrólisis del enlace amida, como las amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), biciclo [2.2.1] y biciclo [2.2.2] sistemas de anillo (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry et al., 15 1990, J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de los fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de la glicina (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmolativos.

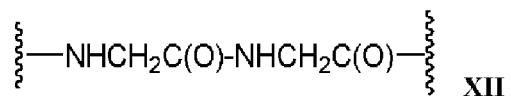
En algunas realizaciones, los restos -D son los mismos. En otra realización más, los restos -D son diferentes.

20 En un aspecto, las unidades espaciadoras (-Y_y) están representadas por las fórmulas (X)-(XII):

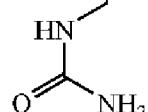
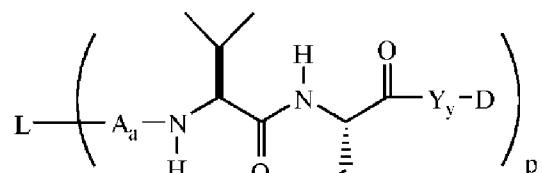
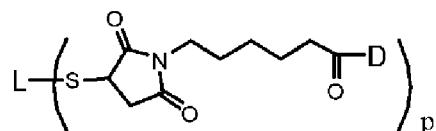
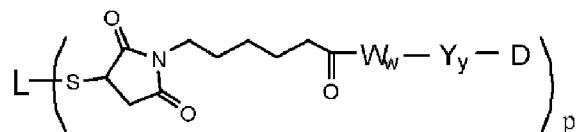


25 en donde Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, -nitró o -ciano; m es un número entero que varía entre 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

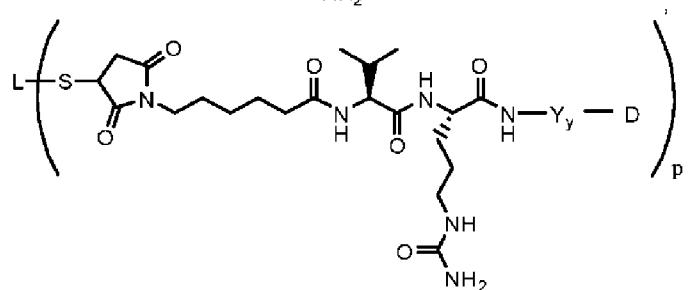
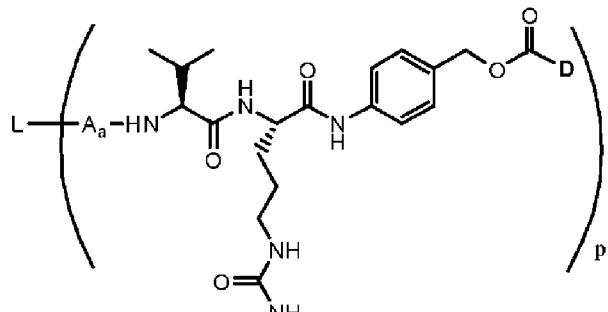




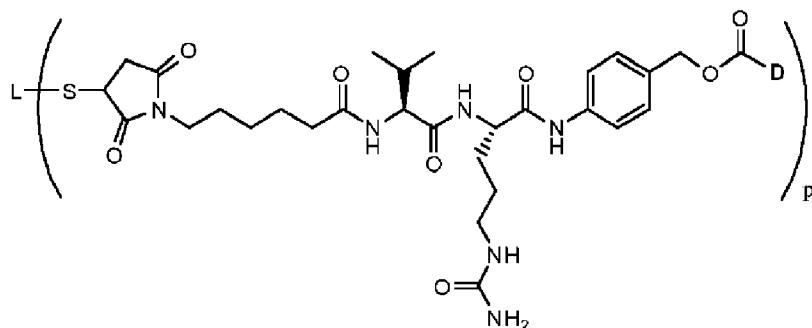
En un grupo de realizaciones seleccionadas, los conjugados de Fórmula I y II son:



10



? y



en donde A_a , W_w , Y_y , D y L tienen los significados proporcionados en el presente documento. En ciertas realizaciones, w e y son cada uno 0, 1 o 2, (preferiblemente cuando w es 1 o 2, y es 1 o 2).

5

La unidad de fármaco

La unidad de fármaco del conjugado anticuerpo-fármaco es una auristatina seleccionada de MMAE y MMAF. La síntesis y estructura de auristatinas ejemplares se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; la Publicación de Patente Internacional N.º WO 04/010957, la Publicación de Patente Internacional N.º WO 02/088172 y las Patentes de EE. UU. N.º 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 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.

15

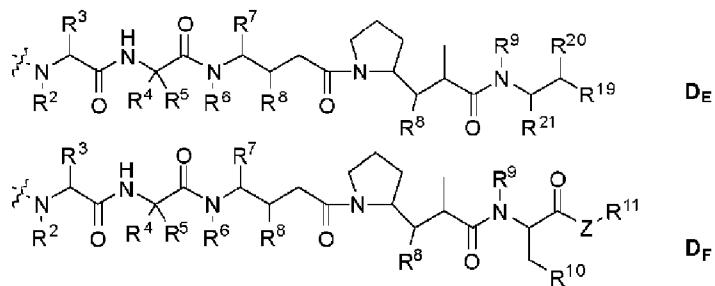
Las auristatinas se han demostrado que interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad anticancerígena. Las auristatinas de la presente invención se unen a la tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático en una línea celular deseada. Existen varios ensayos diferentes, conocidos en la técnica, que pueden usarse para determinar si una auristatina o un conjugado anticuerpo-fármaco resultante ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular deseada.

20

Los métodos para determinar si un compuesto se une a la tubilina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47: 965-976; y Hamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149. Para los fines de la presente invención, se puede determinar la afinidad relativa de un compuesto a tubulina. Algunas auristatinas se unen a la tubulina con una afinidad que varía de 10 veces menor (afinidad más débil) que la afinidad de unión de MMAE a la tubulina de 10 veces, 20 veces o incluso 100 veces mayor (afinidad más alta) que la afinidad de unión de MMAE a la tubulina.

30

Una auristatina puede tener la fórmula D_E o D_F :



35

o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en donde, independientemente en cada ubicación: la línea ondulada indica un enlace;

40

R^2 es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀;

45

R^3 es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo, -alquileno C₁-C₂₀(carbociclo), -alquenileno C₂-C₂₀ (carbociclo), -alquinileno C₂-C₂₀(carbociclo), -arilo, -alquileno C₁-C₂₀(arilo), -alquenileno C₂-C₂₀(arilo), -alquinileno C₂-C₂₀(arilo), -heterociclo, -alquileno C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquinileno C₂-C₂₀(heterociclo);

50

R^4 es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo, -alquileno C₁-C₂₀ (carbociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(carbociclo), -alquinileno C₂-C₂₀(carbociclo), -arilo, -alquileno C₁-C₂₀ (arilo), -alquenileno C₂-C₂₀

- (arilo), -alquinileno C₂-C₂₀ (arilo), -heterociclo, -alquileno C₁-C₂₀ (heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquinileno C₂-C₂₀(heterociclo);
- 5 R⁵ es -H o -alquilo C₁-C₈;
- o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_s - en donde R^a y R^b son independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, o -carbociclo y s es 2, 3, 4, 5 o 6,
- 10 R⁶ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀;
- 15 R⁷ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -alquileno C₁-C₂₀(carbociclo), -alquenileno C₂-C₂₀ (carbociclo), -alquinileno C₂-C₂₀ (carbociclo), -arilo, -alquileno C₁-C₂₀ (arilo), -alquenileno C₂-C₂₀(arilo), -alquinileno C₂-C₂₀ (arilo), heterociclo, -alquileno C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(heterociclo), o -alquinileno C₂-C₂₀(heterociclo);
- 15 cada R⁸ es independientemente -H, -OH, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀), -O-(alquinilo C₁-C₂₀), o -carbociclo;
- 20 R⁹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀;
- 20 R¹⁹ es -arilo, -heterociclo, o -carbociclo;
- 25 R²⁰ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀), -O-(alquinilo C₂-C₂₀), o OR¹⁸ en donde R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo, o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O;
- 25 R²¹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, o -carbociclo;
- 30 R¹⁰ es -arilo o -heterociclo;
- 30 Z es -O-, -S-, -NH-, o -NR¹²-, en donde R¹² es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀;
- 35 R¹¹ es -H, - alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, -(R¹³O)_m-R¹⁴, o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;
- 35 m es un número entero que varía entre 0-1000;
- 35 R¹³ es -alquileno C₂-C₂₀, -alquenileno C₂-C₂₀, o -alquinilenoC₂-C₂₀;
- 40 R¹⁴ es s -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀;
- 40 cada aparición de R¹⁵ es independientemente -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₂₀, -(CH₂)_n-SO₃-alquenilo C₂-C₂₀, o -(CH₂)_n-SO₃-alquinilo C₂-C₂₀;
- 45 cada aparición de R¹⁶ es independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀ o-(CH₂)_n-COOH; y
- 50 n es un número entero que varía de 0 a 6; en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo y heterociclo, ya sea solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.
- Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo y heterociclo no están sustituidos.
- 55 Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en las que los grupos de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ no están sustituidos y los grupos de R¹⁹, R²⁰ y R²¹ están opcionalmente sustituidos como se describe en el presente documento.
- 60 Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en donde
- R² es -alquilo C₁-C₈;
- 65 R³, R⁴ y R⁷ se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -alquileno C₁-C₂₀(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquenileno C₂-C₂₀(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquinileno C₂-C₂₀(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -arilo C₆-C₁₀, -alquileno C₁-C₂₀(arilo C₆-C₁₀), -alquenileno C₂-C₂₀(arilo C₆-C₁₀), -alquinileno C₂-C₂₀(arilo C₆-C₁₀), -heterociclo, -alquileno C₁-C₂₀(heterociclo), -

- alquenileno C₂-C₂₀(heterociclo), o -alquinileno C₂-C₂₀(heterociclo); en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieneno, alquinileno, carbociclo, arilo, y heterociclo están opcionalmente sustituidos.
- 5 R⁵ es -hidrógeno;
- 5 R⁶ es -alquilo C₁-C₈;
- 10 cada R⁸ se selecciona independientemente entre -OH, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀) o -O-(alquinilo C₂-C₂₀), en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;
- 10 R⁹ es -hidrógeno o alquilo C₁-C₈;
- R¹⁹ es fenilo opcionalmente sustituido;
- 15 R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es H, un grupo protector de hidroxilo o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O;
- 20 R²¹ se selecciona entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀ -carbociclo; en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo y carbociclo están opcionalmente sustituidos; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 20 Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en donde
- R² es metilo;
- 25 R³ es -H, -alquilo C_i-C_s, -alquenilo C₂-C₈₀ -alquinilo C₂-C₈, en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;
- 30 R⁴ es -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -arilo C₆-C₁₀, -alquieneno C₁-C₈ (arilo C₆-C₁₀), -alquenileno C₂-C₈ (arilo C₆-C₁₀), -alquinileno C₂-C₈ (arilo C₆-C₁₀), -alquienilo Ci - Cs (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquenileno C₂-C₈ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquinileno C₂-C₈ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico); en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieneno, alquinileno, arilo y carbociclo, ya sea solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos;
- 35 R⁵ es H; R⁶ es metilo;
- 35 R⁷ es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈₀ -alquinilo C₂-C₈;
- cada R⁸ es metoxi;
- 40 R⁹ es -hidrógeno o -alquilo C₁-C₈;
- R¹⁹ es fenilo;
- 45 R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O;
- 45 R²¹ es metilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en donde
- 50 R² es metilo; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es metilo; R⁷ es isopropilo o sec-butilo; R⁸ es metoxi; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁹ es fenilo; R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O; y R²¹ es metilo; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 55 Las auristatinas de la fórmula D_E incluyen aquellas en donde
- R² es metilo o alquilo C₁-C₃; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es alquilo C₁-C₃; R⁷ es alquilo C₁-C₅; R⁸ es alcoxi C₁-C₃; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁹ es fenilo; R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo donde OR¹⁸ representa =O; y R²¹ es alquilo C₁-C₃; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 60 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde
- R² es metilo;
- 65 R³, R⁴, y R⁷ se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀,

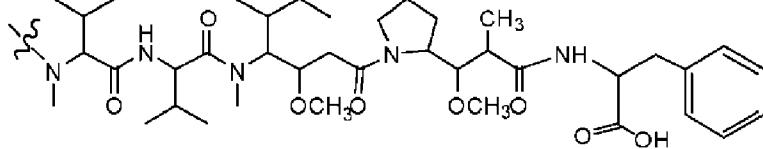
- 5 carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -alquieno C₁-C₂₀(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquenileno C₂-C₂₀(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquinileno C₂-C₂₀(carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -arilo C₆-C₁₀, -alquieno C₁-C₂₀(arilo C₆-C₁₀), -alquenileno C₂-C₂₀(arilo C₆-C₁₀), -alquinileno C₂-C₂₀(arilo C₆-C₁₀), -heterociclo, -alquieno C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenileno C₂-C₂₀(heterociclo), o -alquinileno C₂-C₂₀(heterociclo); en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, alquinileno, carbociclo, arilo, y heterociclo ya sea solos o como parte de otro grupo están opcionalmente sustituidos.
- 10 R⁵ es -H;
- 15 R⁶ es metilo;
- cada R⁸ es metoxi;
- 20 R⁹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀; en donde dicho radical alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;
- R¹⁰ es arilo opcionalmente sustituido o heterociclo opcionalmente sustituido;
- 25 Z es -O-, -S-, -NH-, o -NR¹², en donde R¹² es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, o -alquinilo C₂-C₂₀; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;
- R¹¹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, -(R¹³O)_m-R¹⁴, o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heterociclo están opcionalmente sustituidos;
- 30 m es un número entero que varía entre 0-1000;
- R¹³ es -alquieno C₂-C₂₀, -alquenileno C₂-C₂₀, o -alquinileno C₂-C₂₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;
- 35 R¹⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀; en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;
- cada aparición de R¹⁵ es independientemente -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₂₀, -(CH₂)_n-SO₃-alquenilo C₂-C₂₀, o -(CH₂)_n-SO₃-alquinilo C₂-C₂₀ donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;
- 40 n es un número entero que varía de 0 a 6; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- En ciertas de estas realizaciones, R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido;
- 45 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde los grupos de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ no están sustituidos y los grupos de R¹⁰ y R¹¹ son como se describen en el presente documento.
- Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo y heterociclo no están sustituidos.
- 50 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde R² es alquilo C₁-C₃; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es alquilo C₁-C₃; R⁷ es alquilo C₁-C₅; R⁸ es alcoxi C₁-C₃; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido; Z es O, S, o NH; y R¹¹ es como se define en el presente documento; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 55 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde
- R² es metilo; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es metilo; R⁷ es isopropilo o sec-butilo; R⁸ es metoxi; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈;
- 60 R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido; Z es O, S, o NH; y R¹¹ es como se define en el presente documento; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- Las auristatinas de fórmula D_F incluyen aquellas en donde
- 65 R² es metilo; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es metilo; R⁷ es isopropilo o sec-butilo; R⁸ es metoxi; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁰ es fenilo; y Z es O o NH y R¹¹ es como se define en el presente

documento, preferiblemente hidrógeno; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

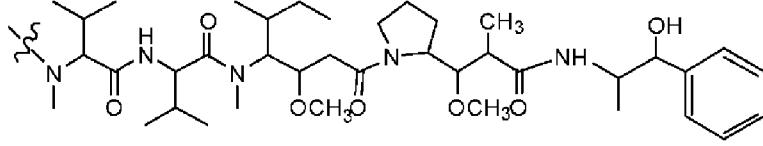
Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde

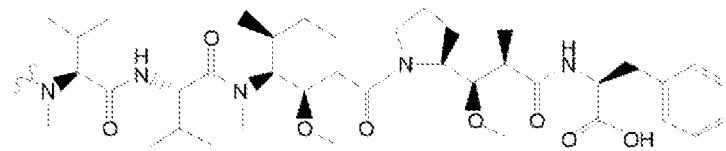
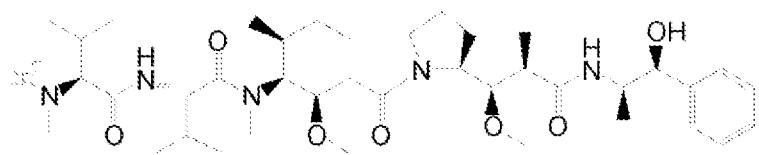
- 5 R² es alquilo C₁-C₃; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es alquilo C₁-C₃; R⁷ es alquilo C₁-C₅; R⁸ es alcoxi C₁-C₃; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁰ es fenilo; y Z es O o NH y R¹¹ es como se define en el presente documento, preferiblemente hidrógeno; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 10 Las auristatinas de la fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en donde R³, R⁴ y R⁷ son independientemente isopropilo o sec-butilo y R⁵ es -H. En una realización ejemplar, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es H, y R⁷ es sec-butilo. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 15 Las auristatinas de la fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en donde R² y R⁶ son cada uno metilo, y R⁹ es H. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.
- 15 Las auristatinas de la fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en donde cada aparición de R⁸ es -OCH₃. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 20 Las auristatinas de la fórmula D_E o D_F incluyen aquellas en donde R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R² y R⁶ son cada uno metilo, R⁵ es H, R⁷ es sec-butilo, cada aparición de R⁸ es -OCH₃, y R⁹ es H. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 25 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde Z es -O- o -NH-. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 25 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde R¹⁰ es arilo. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 30 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde R¹⁰ es -fenilo. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 30 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde Z es -O-, y R¹¹ es H, metilo o t-butilo. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 35 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde, cuando Z es -NH, R¹¹ es -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, en donde R¹⁵ es -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, y R¹⁶ es -alquilo Ci-Cs o -(CH₂)_n-COOH. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- 40 Las auristatinas de la fórmula D_F incluyen aquellas en donde cuando Z es -NH, R¹¹ es -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, en donde R¹⁵ es H o -(CH₂)_n-SO₃H. Los sustituyentes restantes son como se definen en el presente documento.
- En realizaciones preferidas, cuando D es una auristatina de fórmula D_E, w es un número entero que varía de 1 a 12, preferiblemente 2 a 12, y a es 1 o 2, y e es 1 o 2, preferiblemente 1.
- 45 En algunas realizaciones, en donde D es una auristatina de fórmula D_F, a es 1 y w e y son 0.

Las unidades de fármaco ilustrativas (-D) incluyen las unidades de fármaco que tienen las siguientes estructuras:



50

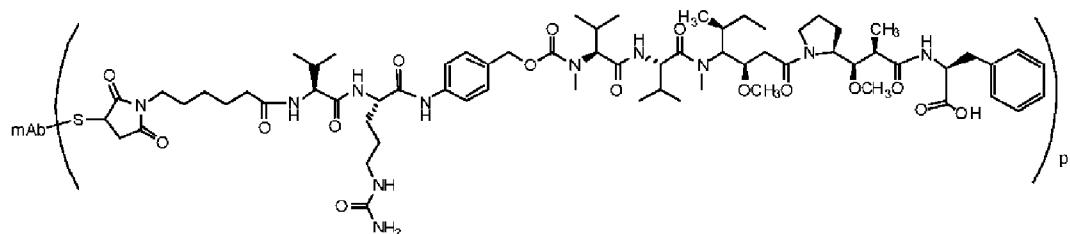




5 o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas.

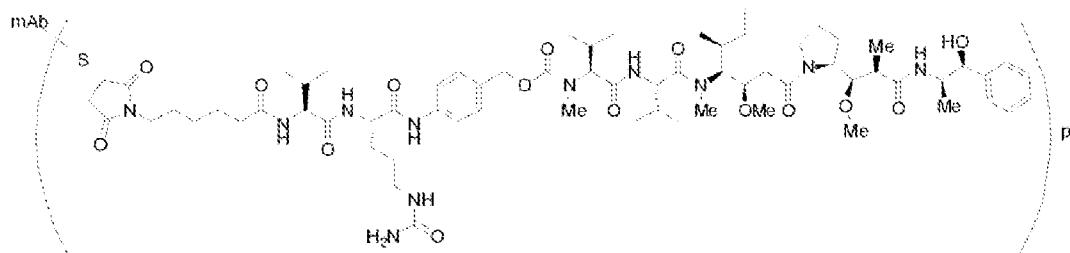
En un aspecto, los grupos hidrófilos, tales como, pero no se limitan a ésteres de trietilenglicol (TEG) se pueden unir a la unidad de fármaco en R¹¹. Sin estar limitados por la teoría, los grupos hidrofílicos ayudan en la internalización y la no aglomeración de la unidad de fármacos.

- 10 Los conjugados anticuerpo-fármaco ejemplares tienen las siguientes estructuras en donde "mAb" representa un anticuerpo monoclonal y S es un átomo de azufre del anticuerpo. En un aspecto, el átomo de azufre es un átomo de azufre de un residuo de cisteína. En una realización, el residuo de cisteína es un residuo de cisteína de un tiol de cadena reducida. En otro aspecto, el residuo de cisteno es un residuo de cisteína introducido en el anticuerpo.
- 15 El subíndice p es un número entero de 1 a aproximadamente 20 y es preferiblemente 1 a aproximadamente 5. En realizaciones, en donde p representa el número promedio de moléculas de fármaco por ligando en una composición que comprende una pluralidad de conjugados anticuerpo-fármaco, p es preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5.



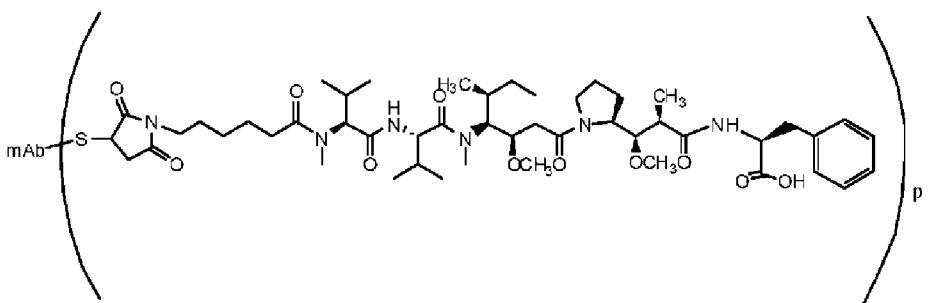
20

L-mc-vc-MMAF



L-mc-vc-MMAE (vcE o vcMMAE)

25 o

**L-mc-MMAF (mcF o mcMMAF)**

o formas de sal farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 Unidad de ligando

En la presente invención, la unidad de ligando (p. ej., anticuerpo) en el conjugado anticuerpo-fármaco se une específicamente a un antígeno de células cancerosas que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa como se define en las reivindicaciones.

10 El anticuerpo se unirá específicamente a un antígeno de células cancerosas que se encuentra en la superficie de una célula cancerosa que demuestra una regulación positiva de la ruta PI3K-AKT-mTOR, incluyendo la activación constitutiva de la ruta PI3K/AKT mTOR. En un aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco muestra actividad citotóxica a través de la internalización.

15 La unidad de ligando (L) tiene al menos un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de una unidad ligadora. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en una unidad de ligando, ya sea de forma natural, mediante manipulación química o mediante ingeniería, incluyen, entre otros, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. En algunas realizaciones, 20 un grupo funcional de unidad de ligando es un grupo sulfhidrilo. El grupo sulfhidrilo es normalmente un grupo sulfhidrilo accesible al disolvente, tal como un grupo sulfhidrilo accesible al disolvente sobre un residuo de cisteína. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reducción de un enlace disulfuro intramolecular o intermolecular de un ligando. Los grupos sulfhidrilo también pueden generarse por reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un ligando usando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo generador de sulfhidrilo.

25 En algunas realizaciones, uno o más grupos sulfhidrilo se diseñan en una unidad de ligando, tal como mediante sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, un grupo sulfhidrilo puede introducirse en una unidad de ligando. En algunas realizaciones, un grupo sulfhidrilo se introduce mediante una sustitución de aminoácido de serina o treonina en un residuo de cisteína, y/o mediante la adición de un residuo de cisteína en una unidad de ligando (un 30 residuo de cisteína diseñado). En algunas realizaciones, el residuo de cisteína es un residuo de cisteína interno, es decir, que no se encuentra en el extremo N o en el extremo C del resto de ligando.

35 Para controlar el número de unidades de fármaco o de ligadores de unidades de fármaco unidas a una unidad de ligando, se pueden eliminar uno o más residuos de cisteína mediante sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, el número de residuos de cisteína accesibles al disolvente en una región bisagra de inmunoglobulina se puede reducir mediante la sustitución de aminoácidos de cisteína a residuos de serina.

40 En algunas realizaciones, una unidad de ligando contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6 7 u 8 residuos de cisteína accesibles al disolvente. En algunas realizaciones, una unidad de ligando contiene 2 o 4 residuos de cisteína accesibles al disolvente.

45 Los anticuerpos empleados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son preferiblemente monoclonales, y pueden ser anticuerpos multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y fragmentos de unión de cualquiera de los anteriores, siempre que puedan conjugarse con un fármaco de auristatina seleccionado entre MMAE y MMAF directa o indirectamente a través de un ligador. Normalmente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser roedores (por ejemplo, ratones y 50 ratas), burros, ovejas, conejos, cabras, cobayas, camélidos, caballos o pollos.

Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de especificidad múltiple mayor. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de diferentes抗原 diana o pueden ser específicos para diferentes epítopos en el mismo抗原 diana. (Véase, por ejemplo, los

documentos WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., 1991, J. Immunol 147:60-69 las Patentes de EE. UU. N.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; y 5.601.819 Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.)

5 Los anticuerpos también pueden describirse en términos de su afinidad de unión a un antígeno diana de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo químico. Un anticuerpo químico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de una inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos químicos se conocen en la técnica (Véase, por ejemplo, Morrison, Science, 1985, 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; Patentes de EE. UU. N.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.)

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, que incluye un anticuerpo revestido. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos que se unen al antígeno deseado y tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie no humana, y regiones estructurales y constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos estructurales de las regiones estructurales humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, o preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de las CDR y los residuos estructurales para identificar los residuos estructurales importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al., Patente de EE. UU. N.º 5.585.089; Riecbmann et al., 1988, Nature 332:323.)

20 El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como los métodos de expresión en fagos (véase anteriormente) utilizando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véase también, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 4.444.887 y 4.716.111; los documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

25 Los ejemplos de anticuerpos son aquellos que se unen específicamente a los antígenos expresados por los cánceres que demuestran la regulación positiva de la ruta PI3K-AKT-mTOR, incluida la activación constitutiva de la ruta PI3K/AKT mTOR. En una realización exemplar, el anticuerpo se unirá al antígeno CD19, CD30 o CD70.

30 Los anticuerpos exemplares incluyen, por ejemplo, formas químicas o humanizadas de los anticuerpos AC10 murino (anti-CD30), 1F6 murino (anti-CD70) y BU12 murino (anti-CD19). El anticuerpo murino AC10 tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:1 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:2. El anticuerpo 1F6 murino tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:4. El anticuerpo BU12 murino tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:7 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:8. Estos anticuerpos se describen adicionalmente en la Patente de EE. UU. N.º 7.090.843; y las publicaciones de EE. UU. Número 20090148942, y 20090136526

35 En una realización exemplar, el anticuerpo es una versión química o humanizada de un anticuerpo de ratón que tiene (i) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:1 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:2; (ii) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:4; o (iii) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:7 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:8. En una realización exemplar, tal anticuerpo comprende además la secuencia de aminoácidos de la región constante gamma I humana expuesta en la SEC ID NO:11 o los aminoácidos 1 a 329 de la SEC ID NO:11 y la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana expuesta en la SEC ID NO:12.

40 En una realización exemplar, el anticuerpo es un anticuerpo AC10 químico tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:1, una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:2. En una realización exemplar, tal anticuerpo comprende además la secuencia de aminoácidos de la región constante gamma I humana expuesta en la SEC ID NO:11 o los aminoácidos 1 a 329 de la SEC ID NO:11 y la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana expuesta en la SEC ID NO:12.

45 En una realización exemplar, el anticuerpo es un anticuerpo h1F6 humanizado que tiene una región variable de

5 cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:5, una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:6. En una realización ejemplar, tal anticuerpo comprende además la secuencia de aminoácidos de la región constante gamma I humana expuesta en la SEC ID NO:11 o los aminoácidos 1 a 329 de la SEC ID NO:11 y la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana expuesta en la SEC ID NO:12.

10 En una realización ejemplar, el anticuerpo es un anticuerpo hBU12 humanizado que tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO:9 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID NO:10. En una realización ejemplar, dicho anticuerpo comprende además la secuencia de aminoácidos de la región constante gamma I humana expuesta en la SEC ID NO:11 o los aminoácidos 1 a 329 de la SEC ID NO:11 y la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana establecida en la SEC ID NO:12.

15 Los anticuerpos pueden analizarse para determinar la unión específica a un antígeno diana mediante métodos convencionales, como por ejemplo, sistemas de inmunoensayos competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A y citometría de flujo. (Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 4.^a ed. 1999); Harlow & 20 Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999.)

25 Además, la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno diana y la tasa de desunión de una interacción anticuerpo-antígeno pueden determinarse por resonancia de plasmón de superficie, FACS de competencia usando anticuerpos marcados u otros ensayos de unión competitiva.

30 Los anticuerpos pueden prepararse utilizando fragmentos que contienen antígeno del antígeno diana mediante procedimientos habituales según el tipo de anticuerpo (véase, por ejemplo, Kohler, et al., Nature, 256:495, (1975); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (C.S.H.P., NY, 1988) Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989) y WO 90/07861; Dower et al., WO 91/17271 y McCafferty et al., WO 92/01047.

Ensayos de citotoxicidad para conjugados anticuerpo-fármaco

35 Se conocen métodos para determinar si un fármaco o un conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citostático y/o citotóxico en una célula. En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado anticuerpo-fármaco puede medirse: exponiendo células que expresan una proteína diana del conjugado anticuerpo-fármaco en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un período de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y midiendo la viabilidad celular. Los ensayos *in vitro* a base de células se pueden usar para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de la apoptosis (activación de caspasa) del conjugado anticuerpo-fármaco.

40 Para determinar si un conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citostático, se puede usar un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células cancerosas que expresan un antígeno diana a una densidad de 5.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos puede ser cultivadas durante un período de 72 horas y se expusieron a 0,5 µCi de ³H-timidina durante las 8 horas finales del período de 72 horas. La incorporación de ³H-timidina en las células del cultivo se mide en presencia y ausencia del conjugado anticuerpo-fármaco.

45 Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis normalmente va acompañada de un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática; e hinchazón de la célula y rotura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza normalmente por la formación de ampollas en la membrana, la condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células cancerosas indica que un conjugado anticuerpo-fármaco es útil en el tratamiento de cánceres.

50 55 La viabilidad celular puede medirse determinando en una célula la captación de un tinte como el rojo neutro, el azul tripán o el azul ALAMARTM (véase, por ejemplo, Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476). En dicho ensayo, las células se incuban en medios que contienen el tinte, las células se lavan y el tinte restante, que refleja la captación celular del tinte, se mide espectrofotométricamente. El tinte de unión a proteínas sulfurodamina B (SRB) también se puede usar para medir la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

60 Alternativamente, se usa una sal de tetrazolio, como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamíferos al detectar células vivas, pero no muertas (véase, por ejemplo, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

65 66 La apoptosis se puede cuantificar midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Se dispone de métodos

fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de tales ensayos, incluyendo TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos a base de ELISA, se describen en Biochemica, 1999, no. 2, pag. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

- 5 La apoptosis también se puede determinar midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, al igual que con la necrosis, la pérdida de integridad de la membrana plasmática se puede determinar midiendo la captación de ciertos tintes (por ejemplo, un tinte fluorescente como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al. Eds., 1992, pag. 3.17.1-3.17.16). Las células también pueden marcarse 10 con un tinte de ADN (por ejemplo, acridina naranja, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y puede observarse la condensación y la marginación de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplásmica, aumento de la formación de ampollas en la membrana y contracción celular.
- 15 La presencia de células apoptóticas se puede medir tanto en los compartimentos unidos como en los "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, ambos compartimentos pueden recogerse eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, combinando las preparaciones después de una etapa de lavado por centrifugación (por ejemplo, 10 minutos a 2000 rpm) y detectando la apoptosis (por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN). (Véase, por ejemplo, Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16).
- 20 25 Los efectos de los conjugados anticuerpo-fármaco pueden probarse o validarse en modelos animales. El experto en la técnica conoce una serie de modelos animales de cáncer establecidos, cualquiera de los cuales puede usarse para evaluar la eficacia de un conjugado anticuerpo-fármaco. Los ejemplos no limitativos de tales modelos se describen *a continuación*. Además, se pueden crear pequeños modelos animales para examinar las eficacias *in vivo* de los conjugados anticuerpo-fármaco implantando líneas de células tumorales humanas en cepas de roedores inmunodeficientes apropiadas, por ejemplo, ratones atípicos desnudos o ratones SCID.

Inhibidores de la ruta PI3K-AKT-mTOR

- 30 mTOR existe en dos tipos de complejos, mTORC1 que contiene la subunidad del rictor y mTORC2 que contiene el rictor. Como se sabe en la técnica, "rictor" se refiere a una proteína reguladora del crecimiento celular que tiene el locus genético humano 5p13.1. Estos complejos se regulan de manera diferente y tienen un espectro diferente de sustratos.
- 35 mTORC2 es generalmente insensible a la rapamicina y a los inhibidores selectivos. Se cree que mTORC2 modula la señalización del factor de crecimiento mediante la fosforilación del motivo hidrófobo C-terminal de algunas quinasas AGC, tal como la Akt. En muchos contextos celulares, se requiere mTORC2 para la fosforilación del sitio S473 de Akt. Así, la actividad de mTORC1 está parcialmente controlada por Akt, mientras que la propia Akt está parcialmente controlada por mTORC2.
- 40 45 50 La estimulación del factor de crecimiento de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) provoca la activación de Akt por fosforilación en los dos sitios clave, S473 y T308. Se ha informado que la activación completa de Akt requiere la fosforilación de S473 y T308Active. Akt promueve la supervivencia y la proliferación celular de muchas maneras, incluyendo la supresión de la apoptosis, la promoción de la captación de glucosa y la modificación del metabolismo celular. De los dos sitios de fosforilación en Akt, se cree que la fosforilación en bucle de activación en T308, mediada por PDK1, es indispensable para la actividad de la quinasa, mientras que la fosforilación del motivo hidrofóbico en S473 potencia la actividad de la quinasa Akt. La fosforilación de AKT en S473 se puede usar como un marcador para la activación constitutiva de la ruta PI3K/AKT mTOR. En algunos aspectos, la fosforilación de AKT tanto en S473 como en T308 se usa como un fabricante para la activación constitutiva de la ruta PI3K/AKT mTOR.

Inhibidores mTOR

- 55 Los inhibidores de mTOR usados en la presente invención pueden proporcionar un efecto sinérgico cuando se usan en terapia de combinación con conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina, como se define en las reivindicaciones, para el tratamiento del cáncer, para la destrucción de células tumorales y/o para inhibir la proliferación de células tumorales.
- 60 Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de mTOR" se refiere a un compuesto o un ligando que inhibe al menos una actividad de una proteína mTOR, tal como, por ejemplo, la actividad de la proteína quinasa serina/treonina en al menos uno de sus sustratos (por ejemplo, p70S6 quinasa 1, 4E-BP1, AKT/PKB y eEF2).

65 Los inhibidores de mTOR de la presente invención pueden unirse directamente e inhibir mTORC1, mTORC2 o tanto mTORC1 como mTORC2 mediante la unión a mTORC1 y/o mTORC1.

Una clase de inhibidores de mTOR para uso en la presente invención son los inhibidores del sitio activo. Estos son

- inhibidores de mTOR que se unen al sitio de unión de ATP (también conocido como bolsillo de unión de ATP) de mTOR e inhiben la actividad catalítica tanto de mTORC1 como de mTORC2. Por consiguiente, en un ejemplo, un inhibidor de mTOR para uso en la presente invención compite con el ATP por unirse al sitio de unión de ATP en mTORC1 y/o mTORC2. Los ensayos ejemplares para determinar si un compuesto compite con ATP son conocidos en la técnica. Uno de estos ensayos se proporciona en el ejemplo 12.
- Una clase de inhibidores de sitios activos para uso en la presente invención son inhibidores de especificidad dual ya que se dirigen e inhiben directamente tanto a PI3K como a mTOR. Los inhibidores de especificidad dual se unen tanto al sitio de unión de ATP de mTOR como a PI3K. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen wortmannin, LY294002, PI-103 (Cayman chemical), SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XI,765 (Exelixis) y NVP-BEZ235 (Novartis). (Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009) En algunos aspectos, el inhibidor de especificidad dual será una imidazoquinazolina (por ejemplo, un derivado de imidazo[4,5-c]quinolina). Se conocen en la técnica ensayos ejemplares para determinar si un compuesto se une a y/o inhibe PI3K y/o mTOR. Uno de estos ensayos se proporciona en el ejemplo 12.
- Otra clase de inhibidores de sitios activos para uso en la presente invención son los inhibidores selectivos de mTOR. Esta clase de inhibidores de mTOR inhibe selectivamente la actividad de mTORC1 y mTORC2 en relación con una o más fosfatidilinositol 3-quinasas tipo I. Las fosfatidilinositol 3-quinasas de tipo I se pueden seleccionar entre, por ejemplo, PI3 quinasa α , PI3 quinasa β , PI3 quinasa γ o PI3 quinasa δ . Estos inhibidores de sitios activos se unen al sitio activo de mTOR pero no a PI3K. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen Torin1 (Guertin y Sabatini), PP242 (2-(4-Amino-1-isopropil-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth) y AZD8055 (Sparks y Guertin, Oncogene, 29, 2733-2744, 2010, Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009). En algunos aspectos, el inhibidor de mTOR será una pirazolopirimidina. Los métodos para determinar la selectividad de los inhibidores de mTOR son conocidos en la técnica. Uno de estos ensayos se proporciona en el ejemplo 12.
- En un aspecto, un inhibidor selectivo de mTOR puede entenderse alternativamente para referirse a un agente que muestra una concentración inhibitoria del 50 % (IC50) con respecto a mTORC1 y/o mTORC2, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más, más baja que la IC50 del inhibidor con respecto a una, dos, tres o más PI3-quinasas de tipo I.
- En algunas realizaciones, un inhibidor selectivo de mTOR puede entenderse alternativamente para referirse a un agente que muestra una concentración inhibitoria del 50 % (IC50) con respecto a mTORC1 y/o mTORC2, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más, más baja que la IC50 del inhibidor con respecto a todas las PI3-quinasas tipo I.
- En otro aspecto más, un inhibidor selectivo de mTOR se puede entender que se refiere a un compuesto que exhibe una concentración inhibitoria del 50 % (IC50) con respecto a mTOR, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 doble, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, o más, más baja que la IC50 del inhibidor con respecto a una o más proteína quinasas.
- Otra clase de inhibidores de mTOR para uso en la presente invención se denominan en el presente documento "rapalogs". Como se usa en el presente documento, el término "rapalogs" se refiere a compuestos que se unen específicamente al dominio FRB de mTOR (dominio de unión a la rapamicina FKBP), están relacionados estructuralmente con la rapamicina y retienen las propiedades inhibitorias de mTOR. El término rapalogs excluye rapamicina. Los rapalogs incluyen ésteres, éteres, oximas, hidrazonas e hidroxilaminas de rapamicina, así como compuestos en los que los grupos funcionales en la estructura del núcleo de rapamicina se han modificado, por ejemplo, por reducción u oxidación. Las sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos también se consideran derivados de rapamicina. En algunas realizaciones, los rapalogs, como la rapamicina, inhiben selectivamente a mTORC1 en relación con mTORC2. Los rapalogs ejemplares para uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, temsirolimus (CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) y OSI-027 (OSI). Los ensayos ejemplares para identificar si un compuesto se une al dominio mTOR FRB son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Chen et al. (1995) PNAS vol. 92 pag. 4947-4951
- Otro inhibidor de mTOR para uso en la presente invención es la rapamicina (sirolimus).
- Cualquiera de los inhibidores de mTOR, incluida cualquiera de las clases de inhibidores de mTOR descritas anteriormente, se puede utilizar en combinación con los conjugados anticuerpo-fármaco basados en auristatina de la presente invención. En algunas realizaciones, el inhibidor de mTOR usado en la presente invención no es rapamicina (sirolimus).
- En un aspecto, los inhibidores de mTOR ejemplares para uso en la presente invención inhiben mTORC1, mTORC2 o tanto mTORC1 como mTORC2 con una IC50 (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente de aproximadamente 100 nm o menos incluso más preferiblemente aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 10 pM, 1 pM, o menos. En un aspecto,

- un inhibidor de mTOR para uso en la presente invención inhibe mTORC1, mTORC2 o tanto mTORC1 como mTORC2 con una IC₅₀ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.
- 5 En un aspecto, los inhibidores de mTOR ejemplares para uso en la presente invención inhiben P13K y mTORC1 o mTORC2 o tanto mTORC1 como mTORC2 y P13K con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente de aproximadamente 100 nm o menos, incluso más preferiblemente aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 10 pM, 1 pM o menos. En un aspecto, 10 un inhibidor de mTOR para uso en la presente invención inhibe P13K y mTORC1 o mTORC2 o tanto mTORC1 como mTORC2 y P13K con una IC₅₀ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.
- 15 Las determinaciones de IC₅₀ puede determinarse usando cualesquiera técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar una IC₅₀ midiendo la actividad de una enzima dada en presencia de un intervalo de concentraciones del inhibidor en estudio. Los valores obtenidos experimentalmente de la actividad de la enzima se representan luego en función de las concentraciones de inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que muestra actividad enzimática al 50 % (en comparación con la actividad en ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor "IC₅₀". Análogamente, otras concentraciones inhibitorias pueden definirse a través de determinaciones apropiadas de actividad.
- 20 Se ha demostrado que mTOR demuestra una actividad catalítica robusta y específica hacia las proteínas del sustrato fisiológico, la proteína quinasa I ribosomal p70 S6 (p70S6K1) y la proteína 1 de unión a eIF4E (4EBP1) según se mide por anticuerpos específicos fosforescentes en transferencia de Western. En un aspecto, las 25 determinaciones de IC₅₀ se pueden realizar midiendo el nivel de fosforilación de las proteínas del sustrato, como p70S6K1 y 4EBP1. Las células, por ejemplo, pueden ponerse en contacto con el inhibidor en estudio en condiciones que normalmente producirían la fosforilación de los sustratos mTOR p70S6K1 y 4EBP1. Las células 30 pueden entonces prepararse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo la fijación o lisis, y analizar los niveles de fosforilación de los sustratos de mTOR. Los niveles de fosforilación se pueden analizar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, el uso de anticuerpos específicos para las formas fosforiladas de los sustratos que se analizarán mediante inmunotransferencia o citometría de flujo.
- 35 La inhibición de la actividad de mTORC1 y/o mTORC2 se puede determinar mediante una reducción en la transducción de señales de la ruta PI3K/Akt/mTOR. Se puede utilizar una amplia variedad de lecturas para establecer una reducción de la salida de dicha ruta de señalización. Algunas lecturas ejemplares no limitativas incluyen (1) una disminución en la fosforilación de Akt en los residuos, incluyendo, pero no limitado a, S473 y T308; (2) una disminución en la activación de Akt como se evidencia, por ejemplo, por una reducción de la fosforilación 40 de sustratos de Akt, incluyendo, pero no limitado a FoxO1/O3a T24/32, GSK3α/β; S21/9, y TSC2 T1462; (3) una disminución en la fosforilación de las moléculas de señalización aguas abajo de mTOR, incluyendo pero no limitado a S6 S240/244 ribosomal, 70S6K T389 y 4EBP1 T37/46; y (4) inhibición de la proliferación de células cancerosas.
- 45 Los ensayos basados en células para establecer la inhibición selectiva de mTORC1 y/o mTORC2 pueden tomar una variedad de formatos. Esto generalmente dependerá de la actividad biológica y/o la lectura de transducción de señal que se esté investigando. Por ejemplo, la capacidad del agente para inhibir la mTORC1 y/o mTORC2 para fosforilar el sustrato(s) aguas abajo, se puede determinar mediante diversos tipos de ensayos de quinasa conocidos en la técnica. Los ensayos representativos incluyen, pero no se limitan a, inmunotransferencia e inmunoprecipitación con anticuerpos como los anticuerpos antifosfotirosina, antifosfoserina o antifosfotreonina que reconocen proteínas fosforiladas. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos que reconocen específicamente una forma fosforilada particular de un sustrato de quinasa (por ejemplo, anti-fosfo AKT S473 o anti-fosfo AKT T308). Además, la actividad de la quinasa puede detectarse mediante ensayos quimioluminiscentes de alto rendimiento. En otro aspecto, se pueden usar ensayos de células individuales, como la citometría de flujo, como 50 se describe en el experimento de flujo de fósforo, para medir la fosforilación de múltiples sustratos de mTOR corriente abajo en poblaciones celulares mixtas.
- 55 El efecto de la inhibición de mTORC1 y/o mTORC2 y/o P13K se puede establecer mediante el ensayo de formación de colonias celulares u otras formas de ensayo de proliferación celular. Una amplia gama de ensayos de proliferación celular está disponible en la técnica, y muchos de los cuales están disponibles como kits. Los ejemplos no limitativos de ensayos de proliferación celular incluyen pruebas para ensayos de captación de timidina tritiada, captación de BrdU (5'-bromo-2'-desoxiuridina) (kit comercializado por Calbiochem), captación de MTS (kit comercializado por Promega), captación de MTT (kit comercializado por Cayman Chemical), captación de tinte CyQUANT® (comercializado por Invitrogen).
- 60 El análisis de la apoptosis y la detención del ciclo celular se puede realizar con cualquier método ejemplificado en el presente documento, así como con otros métodos conocidos en la técnica. Se han diseñado muchos métodos

diferentes para detectar la apoptosis.

El inmunoensayo de fluorescencia de lantánidos con disociación potenciada y los ensayos descritos en Toral-Barz et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 332 (2005), 304-310, se pueden usar para determinar si un compuesto es un inhibidor de mTOR.

5 Inhibidores de PI3K

10 Los inhibidores de PI3K usados en la presente invención pueden proporcionar un efecto sinérgico cuando se usan en terapia de combinación con conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina, donde la auristatina se selecciona entre MMAE y MMAF.

15 Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de PI3K" se refiere a un compuesto o un ligando que se une e inhibe al menos una actividad de PI3K. Las proteínas PI3K se pueden dividir en tres clases, P13Ks de clase 1, P13Ks de clase 2 y P13K de clase 3. Las P13K de clase 1 existen como heterodímeros que consisten en una de las cuatro subunidades catalíticas p110 (p110 α , p110 β , p110 δ , y p110 γ) y una de las dos familias de subunidades reguladoras. Un inhibidor de PI3K de la presente invención se dirige preferiblemente a los inhibidores de PI3K de clase 1. En un aspecto, un inhibidor de PI3K mostrará selectividad para una o más isoformas de los inhibidores de PI3K de clase 1 (es decir, selectividad para p110 α , p110 β , p110 δ , y p110 γ o uno o más de p110 α , p110 β , p110 δ , y p110 γ). En otro aspecto, un inhibidor de PI3K no mostrará selectividad de isoforma. En un aspecto, un inhibidor de PI3K competirá por la unión con ATP al dominio catalítico P13K.

20 Un inhibidor de PI3K se puede, por ejemplo, dirigir a PI3K así como a proteínas adicionales en la ruta PI3K-AKT-mTOR. Un inhibidor de PI3K que se dirige tanto a mTOR como a PI3K puede denominarse inhibidor de mTOR o inhibidor de PI3K. Un inhibidor de PI3K que solo se dirige a PI3K puede denominarse como un inhibidor de PI3K selectivo. En un aspecto, un inhibidor selectivo de PI3K se puede entender que se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibitoria del 50 % con respecto a PI3K que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, o más, más baja que la IC50 del inhibidor con respecto a mTOR y/u otras proteínas en la ruta.

25 30 En un aspecto, los inhibidores de PI3K ejemplares para uso en la presente invención inhiben PI3K con una IC50 (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente de aproximadamente 100 nm o menos, incluso más preferiblemente de aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 10 pM, 1 pM, o menos. En un aspecto, un inhibidor de PI3K para uso en la presente invención inhibe PI3K con una IC50 de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

35 40 45 Los ejemplos de inhibidores de PI3K para uso en combinación con conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina incluyen, por ejemplo, BKM120 (inhibidor de P13K de clase 1, Novartis), XL147 (inhibidor de P13K de clase 1, Exelixis), GDC0941 (inhibidor de P13K de clase 1, Genentech), GSK1059615 (inhibidor de pan-P13K, GlaxoSmithKline), PX-866 (inhibidor de P13K de clase 1; isoformas p110 α , p110 β , y p110 γ , Oncothyreon), y CAL-101 (inhibidor de P13K de clase 1; isoforma p110 δ , Calistoga).

Inhibidores de AKT

50 Los inhibidores de AKT usados en la presente invención pueden proporcionar un efecto sinérgico cuando se usan en terapia de combinación con conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina, donde la auristatina se selecciona entre MMAE y MMAF.

55 Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de AKT" se refiere a un compuesto o un ligando que se une e inhibe al menos una actividad de AKT. Los inhibidores de AKT se pueden agrupar en varias clases, incluyendo los inhibidores a base de lípidos (por ejemplo, los inhibidores que se dirigen al dominio de homología de pleckstrina de la AKT que evita que la AKT se localice en las membranas plasmáticas), los inhibidores de la ATP competitiva y los inhibidores alostéricos. En un aspecto, los inhibidores de AKT actúan uniéndose al sitio catalítico de AKT. En un aspecto, los inhibidores de Akt actúan inhibiendo la fosforilación de AKT diana aguas abajo tales como mTOR.

60 65 Los inhibidores de AKT pueden dirigirse a las tres isoformas de AKT, AKT1, AKT2, AKT3 o pueden ser selectivas a las isoformas y dirigirse solo a una o dos de las isoformas de AKT. Un inhibidor de la AKT puede, por ejemplo, dirigir a AKT así como a proteínas adicionales en la ruta PI3K-AKT-mTOR. Un inhibidor de AKT que solo ataca a AKT puede denominarse un inhibidor selectivo de AKT. En un aspecto, un inhibidor selectivo de AKT se puede entender que se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibitoria del 50 % con respecto a AKT que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, o más baja que la IC50 del inhibidor con respecto a otras proteínas en la ruta.

- En un aspecto, los inhibidores de AKT ejemplares para uso en la presente invención inhiben AKT con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente de aproximadamente 100 nm o menos, incluso más preferiblemente de aproximadamente 60 nM o menos, 5
- aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 10 pM, 1 pM, o menos. En un aspecto, un inhibidor de AKT para uso en la presente invención inhibe AKT con una IC₅₀ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a 10
- aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.
- Los ejemplos de inhibidores de AKT para usar en combinación con conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina incluyen, por ejemplo, perifosina (Keryx), MK2206 (Merck), VQD-002 (VioQuest), XL418 (Exelixis) y PX316 (PROLX Pharmaceuticals).
- 15 Cánceres**
- La presente invención abarca la terapia de combinación para uso en el tratamiento del cáncer como se define en las reivindicaciones. En realizaciones ejemplares, el cáncer a tratar por la presente invención demuestra una regulación positiva de la ruta PI3K-AKT-mTOR.
- La regulación positiva de la ruta PI3K-AKT-mTOR puede determinarse por un aumento en la transducción de la señal de la ruta PI3K/Akt/mTOR. Se puede utilizar una amplia variedad de lecturas para establecer un aumento en la salida de dicha ruta de señalización. Algunas lecturas ejemplares no limitativas incluyen (1) un aumento en la fosforilación de Akt en los residuos, incluyendo, pero no limitado a S473 y T308; (2) un aumento en la activación de Akt como lo demuestra la reducción de la fosforilación de los sustratos de Akt, incluyendo, pero no limitado a Fox01/O3a T24/32, GSK3α/β; S21/9, y TSC2 T1462; y (3) un aumento en la fosforilación de las moléculas de señalización aguas abajo de mTOR, incluyendo pero no limitado a S6 S240/244 ribosomal, 70S6K T389 y 4EBP1 T37/46.
- Por consiguiente, en un aspecto, un cáncer que se va a tratar mediante la presente invención es uno en el que la ruta PI3K/AKT mTOR se activa constitutivamente, como lo demuestra la presencia de AKT fosforilada (pAkt) y, en particular, la fosforilación de AKT al menos uno de los dos sitios clave, S473 y T308, y, preferiblemente, en ambos sitios. En un aspecto, el tejido canceroso tendrá niveles elevados de pAkt en comparación con el tejido no canceroso.
- En otro aspecto, un cáncer que se va a tratar mediante la presente invención es uno en el que la ruta PI3K/AKT mTOR está regulada positivamente, como lo demuestra la presencia de la proteína quinasa I ribosomal p70 S6 fosforilada (p70S6K1), la proteína ribosomal S6 fosforilada y/o proteína 1 de unión e1F4E. En un aspecto, el tejido canceroso tendrá niveles elevados de p70S6K1 y/o fosfo-proteína 1 de unión e1F4E en comparación con tejido no canceroso.
- La presencia de pAkt se ha informado previamente en muchos tipos de cáncer. Tales cánceres incluyen neoplasias malignas hematológicas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención descrita en el presente documento es para uso en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas. En un aspecto, las neoplasias malignas hematológicas son los linfomas. En un aspecto, las neoplasias malignas hematológicas son los linfomas de células B. En otra realización, las neoplasias malignas hematológicas son los linfomas de células T. Ejemplos de linfomas particulares incluyen el linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin (NHL). Los ejemplos de NHL incluyen, por ejemplo, linfoma de células del manto, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma cutáneo de células T, linfoma periférico de células T, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt y linfoma folicular. En otra realización, las neoplasias malignas hematológicas son una leucemia, tal como, por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda o la leucemia linfocítica crónica.
- La presencia de pAkt ha sido reportada previamente en muchos tumores sólidos, incluyendo, por ejemplo, cáncer colorrectal, renal, gástrico, de próstata, DE tiroides, endometrial, de pulmón, de cerebro y de mama. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención descrita en el presente documento es para uso en el tratamiento de tumores sólidos. Los ejemplos de tumores sólidos tratables mediante la invención incluyen, por ejemplo, cáncer colorrectal, renal, gástrico, de próstata, de tiroides, endometrial, de pulmón, de cerebro y de mama. En un aspecto, el cáncer es el carcinoma de células renales.
- La presente invención abarca la terapia de combinación para uso en el tratamiento de los cánceres caracterizados por la presencia de pAkt. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la neoplasia maligna hematológica, el linfoma, el linfoma Hogkin, la NHL o la leucemia tratable por la presente invención expresarán AKT fosforilado. De manera similar, en algunas realizaciones, el cáncer de tumor sólido, colorrectal, renal, gástrico, próstata, tiroides, endometrio, pulmón, cerebro o mama expresará AKT fosforilado. La expresión puede ser citoplásica o nuclear. En un aspecto, la expresión es sustancialmente citoplásica. En otro aspecto, la expresión es sustancialmente nuclear. En otro aspecto, la expresión es citoplásica y nuclear.

- La presente invención abarca una terapia de combinación para uso en el tratamiento de cánceres caracterizados por la presencia de la proteína quinasa I ribosomal p70 S6 fosforilada (p70S6K1) y/o la proteína 1 de unión e1F4E. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la neoplasia maligna hematológica, linfoma, linfoma de Hogkin o NHL tratable mediante la presente invención expresará la proteína quinasa I ribosomal p70 S6 fosforilada (p70S6K1) y/o la proteína 1 de unión e1F4E. De manera similar, en algunas realizaciones, el tumor sólido, el cáncer colorrectal, renal, gástrico, de próstata, de tiroides, endometrial, de pulmón, de cerebro o de mama expresará la proteína quinasa I ribosomal p70 S6 fosforilada (p70S6K1) y/o e1F4E (fosfo-proteína de unión 1 e1F4E).
- 5 10 15 20 En algunas realizaciones, el cáncer tendrá una alta expresión de pAKT. En realizaciones ejemplares, alta expresión de pAKT se refiere a un número mediano de células p-AKT+/mm² de área de tumor mayor que aproximadamente 25 células/mm², mayor que 50 células/mm², o incluso mayor que 100 células/mm². La determinación de la cantidad de células pAKT+ se realiza generalmente utilizando técnicas de inmunohistoquímica.
- 25 30 35 40 45 Cualquiera de los cánceres descritos en el presente documento puede tratarse utilizando una terapia de combinación con un conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina y un inhibidor de mTOR, incluyendo cualquiera de las clases de inhibidores de mTOR descritos en el presente documento, y cualquiera de los conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina descrito en el presente documento, como se define en las reivindicaciones. El componente de anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina se unirá específicamente a un antígeno de células cancerosas que se expresa en la superficie de la célula cancerosa a tratar, como se define en las reivindicaciones.
- En algunas realizaciones, el cáncer será uno que exprese un antígeno CD30 y el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina será uno que se une específicamente al antígeno CD30 (por ejemplo, el componente del anticuerpo es un anticuerpo anti-CD30, preferiblemente un anticuerpo monoclonal anti-CD30). El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina después de unirse al antígeno se internalizará en las células cancerosas, donde ejerce su efecto. En un aspecto, el cáncer que expresa el antígeno CD30 expresa pAKT (AKT fosforilado en S473 y T308). En un aspecto, el cáncer tendrá una alta expresión de pAKT. El cáncer puede ser, por ejemplo, un tumor maligno hematológico, que incluye, por ejemplo, linfoma de células B o células T o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es linfoma Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma cutáneo de células T, linfoma periférico de células T, o cualquiera de los otros cánceres que expresan CD30 descritos en el presente documento, incluyendo tumores sólidos. Por consiguiente, la terapia de combinación de acuerdo con la presente invención puede incluir la administración del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD30 con un inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR para el tratamiento de un cáncer que expresa CD30 (por ejemplo, linfoma de células B o de células T, linfoma Hodgkin, NHL, leucemia o tumor sólido). En algunos aspectos, el inhibidor será un inhibidor de mTOR, un inhibidor de PI3K o un inhibidor de AKT. En un aspecto, el inhibidor de mTOR será un inhibidor del sitio activo, que incluye, por ejemplo, un inhibidor de especificidad dual, como wortmannin, LY294002, PI-103, BGT226, SF1126, XI,765 y NVP-BEZ235 (Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009) o un inhibidor selectivo de mTOR, que incluye, por ejemplo, Torin1, PP242, PP30, Ku-0063794, WAY-600, WAY-687, WAY-354 y AZD8055. En otros aspectos, el inhibidor de mTOR será un rapalog, incluido, por ejemplo, temsirolimus (CC1779), everolimus (RAD001) y deforolimus (AP23573). En un aspecto, el inhibidor será un inhibidor de AKT que incluye, por ejemplo, perifosina, MK2206, VQD-002, XI,418 y PX316. En otro aspecto, el inhibidor será un inhibidor de PI3K, que incluye, por ejemplo, BKM120, XI,147, GDC0941, GSK1059615, PX-866 o CAL-101.
- 50 55 60 65 En algunas realizaciones, el cáncer será uno que exprese un antígeno CD70 y el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina será uno que se une específicamente al antígeno CD70 (por ejemplo, el componente del anticuerpo es un anticuerpo anti-CD70, preferiblemente un anticuerpo monoclonal anti-CD70). El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina después de unirse al antígeno se internalizará en las células cancerosas, donde ejerce su efecto. En un aspecto, el cáncer que expresa el antígeno CD70 expresa pAKT (AKT fosforilado en S473 y T308). En un aspecto, el cáncer tendrá una alta expresión de pAKT. El cáncer puede ser, por ejemplo, un tumor maligno hematológico, que incluye, por ejemplo, linfoma de células B o células T o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es un linfoma no Hodgkin, que incluye cualquiera de los NHL descritos en el presente documento (por ejemplo, linfoma de células del manto y linfoma difuso de células grandes B). En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido, que incluye, por ejemplo, el carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el cáncer es una leucemia, que incluye, por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica o la leucemia linfoblástica aguda. Por consiguiente, la terapia de combinación de acuerdo con la presente invención puede incluir la administración del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD70 con un inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR para el tratamiento de un cáncer que expresa CD70 (por ejemplo, linfoma de células B o células T, leucemia, NHL o tumor sólido, incluido el carcinoma de células renales). En algunos aspectos, el inhibidor será un inhibidor de mTOR, un inhibidor de PI3K o un inhibidor de AKT. En algunos aspectos, el inhibidor de mTOR será un inhibidor de sitio activo, incluido, por ejemplo, un inhibidor de especificidad dual, como wortmannin, LY294002, PI-103, BGT226, SF1126, XI,765 y NVP-BEZ235 (Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009) o un inhibidor selectivo de mTOR, que incluye, por ejemplo, Torin1, PP242, PP30, Ku-0063794, WAY-600, WAY-687, WAY-354 y AZD8055. En otros aspectos, el inhibidor de mTOR será un rapalog, incluido, por ejemplo, temsirolimus (CC1779), everolimus (RAD001) y deforolimus (AP23573). En un aspecto, el inhibidor será un inhibidor de AKT

que incluye, por ejemplo, perifosina, MK2206, VQD-002, XI,418 y PX316. En otro aspecto, el inhibidor será un inhibidor de PI3K, que incluye, por ejemplo, BKM120, XI,147, GDC0941, GSK1059615, PX-866 o CAL-101.

En algunas realizaciones, el cáncer será uno que exprese un antígeno CD19 y el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina será uno que se une específicamente al antígeno CD19 (por ejemplo, el componente del anticuerpo es un anticuerpo anti-CD19, preferiblemente un anticuerpo monoclonal anti-CD19). El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina después de unirse al antígeno se internalizará en las células cancerosas, donde ejerce su efecto. En un aspecto, el cáncer que expresa el antígeno CD19 expresa pAKT (AKT fosforilado en S473 y T308). En un aspecto, el cáncer tendrá una alta expresión de pAKT. El cáncer puede ser, por ejemplo, un tumor maligno hematológico, que incluye, por ejemplo, un linfoma de células B o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es un linfoma no Hodgkin, incluido cualquiera de los NHL descritos en el presente documento (por ejemplo, linfoma de células del manto y linfoma difuso de células grandes B). En algunas realizaciones, el cáncer es una leucemia, que incluye, por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica o la leucemia linfoblástica aguda. Por consiguiente, la terapia de combinación de acuerdo con los presentes métodos puede incluir la administración del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD19 con un inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR para el tratamiento de un cáncer que expresa CD19 (por ejemplo, linfoma de células B, leucemia, o NHL). En algunos aspectos, el inhibidor será un inhibidor de mTOR, un inhibidor de PI3K o un inhibidor de AKT. En algunos aspectos, el inhibidor de mTOR será un inhibidor de sitio activo, que incluye, por ejemplo, un inhibidor de especificidad dual, como wormannin, LY294002, PI-103, BGT226, SF1126, XI,765 y NVP-BEZ235 (Liu et al., Nature Review, 8, 627-644, 2009) o un inhibidor selectivo de mTOR, que incluye, por ejemplo, Torin1, PP242, PP30, Ku-0063794, WAY-600, WAY-687, WAY-354 y AZD8055. En otros aspectos, el inhibidor de mTOR será un rapalog, incluido, por ejemplo, temsirolimus (CC1779), everolimus (RAD001) y deforolimus (AP23573). En un aspecto, el inhibidor será un inhibidor de AKT que incluye, por ejemplo, perifosina, MK2206, VQD-002, XI,418 y PX316. En otro aspecto, el inhibidor será un inhibidor de PI3K, que incluye, por ejemplo, BKM120, XI,147, GDC0941, GSK1059615, PX-866 o CAL-101.

El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD30, anti-CD19 o anti-CD70 para uso en terapia de combinación con un inhibidor de mTOR puede tener cualquiera de las estructuras proporcionadas en el presente documento para los conjugados anticuerpo-fármaco a base de auristatina. En un aspecto, el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD30, anti-CD19 o anti-CD70 se conjuga mediante un ligador a las auristatinas MMAE o MMAF. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD30, anti-CD19 o anti-CD70 puede ser, por ejemplo, un conjugado anticuerpo-fármaco vcMMAE o mcF anti-CD30, anti-CD19 o anti-CD70 (por ejemplo, cAC10-vcE, h1F6-mcF, o hBU12-mcF). En un aspecto, una composición que comprende conjugados anticuerpo-fármaco vcMMAE o mcF anti-CD30, anti-CD19, o anti-CD70 tiene un promedio de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 fármacos por anticuerpo. En un aspecto, cada fármaco está unido al anticuerpo a través de un átomo de azufre de un residuo de cisteína de un enlace disulfuro entre cadenas reducido. En otro aspecto, cada fármaco está unido al anticuerpo a través de un átomo de azufre de un residuo de cisteína introducido. El residuo de cisteína se introduce preferiblemente en la región CH2 del anticuerpo.

Terapia de combinación

Se ha encontrado que la terapia de combinación con un conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina, donde la auristatina se selecciona entre MMAE y MMAF, y un inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR, como se define en las reivindicaciones, puede proporcionar un efecto sinérgico.

Como se usa en el presente documento, el término "sinergia" o "efecto sinérgico" cuando se usa en relación con una descripción de la eficacia de una combinación de agentes, significa cualquier efecto medido de la combinación que sea mayor que el efecto predicho a partir de una suma de los efectos de los agentes individuales.

La sinergia de dos compuestos puede determinarse mediante el uso de un método *in vitro*. Por ejemplo, el sinergismo, la aditividad o el antagonismo para cada combinación de fármacos puede determinarse utilizando la ecuación de efecto mediano de Chou-Talalay:

$$D = D_m [f_a / (1 - f_a)]^{1/m} \quad \text{Ecuación de efecto mediano}$$

(D) es la dosis del fármaco. (D_m) es la dosis de efecto mediano que significa la potencia. Esto se determina por la intersección con x de la gráfica de efecto mediana. (f_a) es la fracción afectada por la dosis. (f_u) es la fracción no afectada, ($1 - f_a$). (m) es un exponente que significa la sigmoidicidad (forma) de la curva dosis-efecto. Está determinada por la pendiente de la gráfica de efecto mediana. El coeficiente de correlación lineal "r" debe ser mayor o igual a 0,90. Las unidades de concentración de fármacos son arbitrarias. Los valores del índice de combinación (CI) <0,9 indican sinergismo, los valores de CI 0,9-1,1 indican aditividad y los valores de CI> 1,1 indican antagonismo.

En un ejemplo para determinar la sinergia *in vivo*, los tumores se recogen de animales donantes, se desagregan,

se cuentan y se vuelven a inyectar en ratones huéspedes. Las combinaciones de anticancerígenos generalmente se inyectan después en algún momento(s) posterior(es), ya sea por ruta intraperitoneal, intravenosa o administrada por vía oral, y se determinan las tasas de crecimiento del tumor y/o la supervivencia, en comparación con los controles no tratados y los controles expuestos solo a una de las terapias. Las tasas de crecimiento generalmente

5 se miden para los tumores que crecen en el flanco delantero del animal, donde los diámetros perpendiculares del ancho del tumor se traducen en una estimación de la masa o volumen total del tumor. El tiempo para alcanzar una masa predeterminada (por ejemplo, el tiempo para que el tumor se triplique) se compara con el tiempo requerido para un crecimiento tumoral igual en los animales de control. Si el tiempo para alcanzar la masa predeterminada para el animal tratado con la terapia de combinación es mayor que el valor obtenido al añadir el tiempo para alcanzar la masa predeterminada para el animal tratado con la terapia "A" y el animal tratado con la terapia "B" (es decir, cada terapia por sola), se puede decir que la terapia de combinación proporciona un efecto sinérgico. En otro ejemplo, el tiempo para alcanzar la masa predeterminada para el animal tratado con la terapia de combinación podría no ser mayor que el valor obtenido al añadir el tiempo para alcanzar la masa predeterminada para el animal tratado con la terapia "A" y el animal tratado con terapia "B"; sin embargo, otro efecto medido de la combinación

10 15 que es mayor que el predicho a partir de la suma de los efectos de los agentes individuales es suficiente para identificar/determinar la terapia de combinación como sinérgica. Por ejemplo, si el número de respuestas duraderas o completas para los animales tratados con la terapia de combinación es mayor que la suma del número de respuestas duraderas o completas en cada brazo de tratamiento solo, la terapia combinada proporciona un efecto sinérgico. Una respuesta duradera (DR) se define como la ausencia de tumor palpable en el animal.

20 25 30 35 40 45 50 55

En general, la cantidad de conjugado a base de auristatina e inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR que es eficaz en el tratamiento del cáncer puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos in vitro pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se debe emplear en la formulación también depende de la ruta de administración y el estadio del cáncer, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales.

Por ejemplo, al determinar una interacción sinérgica entre dos o más componentes, el intervalo óptimo para el efecto y el intervalo de dosis absoluta de cada componente se puede medir mediante la administración de los componentes en diferentes intervalos de relación p/p pacientes en necesidad de tratamiento. La observación de la sinergia en una especie puede ser predictiva del efecto en otras especies y existen modelos animales para medir un efecto sinérgico y los resultados de dichos estudios pueden usarse para predecir los intervalos de dosis eficaces y de concentración plasmática, y las dosis absolutas y las concentraciones plasmáticas requeridas en otras especies mediante la aplicación de métodos farmacocinéticos y farmacodinámicos.

30 35 40 45 50 55

En algunas realizaciones, los dos fármacos, el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR y el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina se administrarán a un sujeto en sus respectivas dosis máximas tolerables (MTD). La MTD corresponde a la dosis más alta de un medicamento que se puede administrar sin efectos secundarios inaceptables. Está dentro de la técnica para determinar MTD. En algunos aspectos, el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina se proporcionará en su MTD y el inhibidor de mTOR se administrará en dosis del 50 % al 100 %, preferiblemente del 50 % al 90 % de la MTD. Alternativamente, el inhibidor de mTOR se dosificará en un 50 % al 100 %, preferiblemente en un 50 % al 90 % de la MTD y el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina se administrará en un 50 % al 100 %, preferiblemente en un 50 % al 90 % de la MTD. En algunos aspectos, tanto el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina como el inhibidor de mTOR se administrarán en un 60 % al 90 % de la MTD. En ciertos aspectos, al administrar el inhibidor de mTOR a una dosis reducida en comparación con la MTD en combinación con el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina, se puede reducir la toxicidad asociada con el tratamiento (es decir, los efectos adversos). En un ejemplo, cuando se usa para tratar un cáncer que expresa CD70, se proporcionará el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina en su MTD y el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR se administrará en un 50 % al 90 % de la MTD o incluso del 30 % al 75 % de la MTD. En un aspecto, el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR se administrará en dosis de un 50 % al 90 % de la MTD o incluso del 30 % al 75 % de la MTD y el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD70 (por ejemplo, h1F6- mcF) se administrará a 0,5 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4,5 mg/kg o 6 mg/kg por dosis (por ejemplo, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg 3 mg/kg, 4,5 mg/kg o 6 mg/kg cada 3 semanas).

40 45 50 55

Los inhibidores de mTOR, los inhibidores de PI3K y los inhibidores de AKT se proporcionan actualmente tanto en forma de dosis oral como en forma i.v. En una realización ejemplar, basándose en los resultados obtenidos con temsirolimus, el inhibidor de mTOR se proporcionará en una dosis de infusión iv. En un aspecto, la dosis será de entre, por ejemplo, aproximadamente 0,1 y 100 mg/m², siendo preferido entre aproximadamente 2,5 y 70 mg/m². Actualmente, el inhibidor de mTOR temsirolimus se administra a una dosis de 25 a 50 mg en una infusión semanal (generalmente 25 mg) para el tratamiento del carcinoma de células renales. En otra realización ejemplar, basándose en los resultados obtenidos con el everolimus, el inhibidor de mTOR se proporcionará en forma oral. En un aspecto, la dosis será de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg al día, prefiriéndose de aproximadamente 2,5 mg a 20 mg al día. Actualmente, el inhibidor de mTOR everolimus se administra por vía oral en una dosis diaria de aproximadamente 2,5 mg a 20 mg al día (generalmente 10 mg) para el tratamiento del carcinoma de células renales.

- La dosis del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina estará normalmente entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto por dosis. En algunas realizaciones, la dosis estará entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg por dosis o entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 7 mg/kg por dosis. En realizaciones particulares, la dosis será de aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,8 mg/kg, aproximadamente 2,0 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 4,5 mg/kg o aproximadamente 6 mg/kg del peso corporal del sujeto.
- Tal como se utiliza en esta invención, el régimen de combinación puede administrarse simultáneamente o puede administrarse en un régimen secuencial, con el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR administrado en un momento diferente durante el curso de la terapia al del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina. En un aspecto, el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR se proporciona antes del conjugado de fármaco. En otro aspecto, el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR se proporciona siguiendo el conjugado de fármaco. Esta diferencia de tiempo puede variar desde varios minutos, horas, días o semanas, entre la administración de los dos agentes. Por lo tanto, el término combinación no significa necesariamente administrado al mismo tiempo o como una dosis unitaria, sino que cada uno de los componentes se administra durante un período de tratamiento deseado. En algunos métodos, los agentes respectivos se administran con una proximidad suficiente como para que durante algún tiempo los agentes estén presentes simultáneamente en niveles detectables en el paciente que se está tratando, por ejemplo, tanto el inhibidor de mTOR como el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina son detectables en la sangre (por ejemplo, suero o plasma). Los agentes pueden ser administrados por diferentes rutas. Como es típico de los regímenes quimioterapéuticos, un ciclo de quimioterapia puede repetirse varias semanas después, y puede seguir el mismo período de tiempo para la administración de los dos agentes, o puede modificarse según la respuesta del paciente. Como es típico en la quimioterapia, los regímenes de dosis son controlados de cerca por el médico tratante, basándose en numerosos factores que incluyen la gravedad de la enfermedad, la respuesta a la enfermedad, cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento, la edad, la salud del paciente y otros trastornos o tratamientos concomitantes.
- La presente invención abarca programas de tratamiento en los que el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco se administra una vez durante un ciclo de tratamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco se administrará el día 1 de un ciclo de tratamiento de 21 días. En algunas de estas realizaciones, la dosis del compuesto conjugado anticuerpo-fármaco administrado a un paciente será normalmente, por ejemplo, de 0,8 mg/kg a 8 mg/kg del peso corporal del sujeto durante el ciclo de tratamiento, preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 7 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 2,2 mg/kg, o de 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg durante el ciclo de tratamiento.
- La presente invención abarca programas de tratamiento en los que el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco se administrará más de una vez durante un ciclo de tratamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco se administrará semanalmente durante tres semanas consecutivas en un ciclo de 28 días. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-fármaco se administrará los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de tratamiento de 28 días. En algunas de estas realizaciones, la dosis del compuesto conjugado anticuerpo-fármaco administrado a un paciente será de 0,8 mg/kg a 8 mg/kg del peso corporal del sujeto durante el ciclo de tratamiento, preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 7 mg/kg de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 2,2 mg/kg, o de 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg durante el ciclo de tratamiento.
- En un aspecto, para el tratamiento de un cáncer hematopoyético que expresa CD30, como el linfoma Hodgkin o la ALCL, el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina se administra semanalmente a una dosis de aproximadamente 1 mg/kg o cada tres semanas a una dosis de aproximadamente 1,8 mg/kg.
- En un aspecto, para el tratamiento de un cáncer que expresa CD70 (por ejemplo, NHL o carcinoma de células renales), el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina se administra cada tres semanas a una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,8 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4,5 mg/kg, 6 mg/kg o 8 mg/kg.
- En ciertas realizaciones ejemplares, la administración tanto del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina como del inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR es por infusión. En un aspecto, la administración del inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR es por vía iv (por ejemplo, infusión) o administración oral.
- El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina e inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR se puede administrar como composiciones que incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica incluye normalmente uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los derivados del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, como el aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares). El agua es un vehículo más típico cuando la composición farmacéutica se administra por

ruta intravenosa. Las disoluciones salinas y las disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica. La composición, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por EW Martin. Las formulaciones corresponden al modo de administración.

- En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las 10 composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Dónde sea necesario, el producto farmacéutico también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local como la lidocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Por lo general, los ingredientes se suministran ya sea por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o sachet que indique la 15 cantidad del agente activo. Cuando el producto farmacéutico se administra mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando el producto farmacéutico se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o disolución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.
- 20 En ciertas realizaciones, el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR puede estar en una forma adecuada para administración oral, tal como en forma de píldora, cápsula, disolución o suspensión. Dichas formulaciones pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para producir formulaciones orales y pueden contener uno o más agentes que incluyen agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes. Si en forma de comprimido, las composiciones pueden comprender excipientes de 25 comprimido, como un relleno o diluyente (por ejemplo, carbonato de calcio o sodio, fosfato de calcio o sodio), un desintegrante (almidón de maíz o ácido algínico), un aglutinante (por ejemplo, almidón, gelatina o acacia), un deslizante, un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco), un antiadherente, un sabor o un colorante.
- 30 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- 35 Se proporcionan ejemplos para ayudar a una comprensión adicional de las invenciones. Los materiales, protocolos y condiciones particulares utilizados tienen como objetivo ilustrar mejor las invenciones.

Ejemplo 1

Cultivo de línea celular

- 40 Las células 786-O se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 + suero bovino fetal al 10 % (FBS). Las células Caki-1 se cultivaron en medio 5A de McCoy + FBS al 10 %. Las células Caki-2 se cultivaron en medio 5A de McCoy + FBS al 2 %. Las células 786-O, Caki-1, y Caki-2 (líneas celulares de carcinoma de células renales) se cultivaron todas a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células L540cy se cultivaron en RPMI 1640 + FBS al 20 %. Las células L428 se cultivaron en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Las líneas celulares L540cy y L428 son líneas celulares de linfoma Hodgkin. Las células Karpas-299 se cultivaron en RPMI 1640 + FBS al 10 %. La línea celular Karpas-299 es una línea celular anaplásica de linfoma de células grandes (ALCL). Las células HT se cultivaron en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Las células Raji 4RH (clon-11) fueron un regalo de Francisco J. Hernandez-Ilizaliturri y se cultivaron en RPMI 1640 + 10 % de FBS. Las líneas celulares HT y Raji 4RH son líneas celulares de linfoma no Hodgkin. Las células Jeko-1 se cultivaron en RPMI-1640 + FBS al 10 %. Las líneas celulares Jeko-1 son líneas celulares de linfoma de células del manto.

Ejemplo 2

Métodos in vitro de prueba de auristatina ADC o auristatina libre y combinaciones de inhibidores de la ruta de mTOR

- Las células se colocaron en placas de 100 µl de medio de crecimiento por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo transparente de pared negra. A continuación, se prepararon reservas de trabajo de concentración 4X de inhibidor de molécula pequeña y conjugado anticuerpo-fármaco, y luego se valoraron como diluciones en serie 2 veces produciendo curvas de dosis de 10 puntos. Para las condiciones de un solo fármaco, se agregaron 50 µl de inhibidor de molécula pequeña o ADC o auristatina libre a cada pocillo por cuadruplicado con 50 µl de medio, produciendo un volumen final de 200 µl por pocillo. Para las condiciones de combinación, 50 µl inhibidor molécula pequeña y 50 µl ADC o dilución auristatina libre se añadieron a las células (que recubre las valoraciones de dosis de cada fármaco: alto a bajo) por cuadruplicado producir un volumen final de 200 µl por pocillo. Las células tratadas se incubaron 96 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. La citotoxicidad se midió mediante incubación con 100 µl de disolución

de Glo Titer Cell (Promega) durante 1 hora y luego se midió la luminescencia en un lector de placas Fusion HT (Perkin Elmer). Los datos se procesaron con Excel (Microsoft) y GraphPad (Prism) para producir curvas de respuesta a la dosis y calcular la fracción afectada (f_a) en cada concentración de dosis. Luego se usó el software CalcuSyn (Biosoft) para determinar el sinergismo, la aditividad o el antagonismo para cada combinación de fármacos utilizando la ecuación de efecto mediano de Chou-Talalay:

$$D = D_m[f_a/(1-f_a)]^{1/m} \quad \text{Ecuación de efecto mediano}$$

(D) es la dosis del fármaco (D_m) es la dosis de efecto mediano que significa la potencia. Esto se determina por la intersección con x de la gráfica de efecto mediana. (f_a) es la fracción afectada por la dosis. (f_u) es la fracción no afectada, ($1-f_a$). (m) es un exponente que significa la sigmoidicidad (forma) de la curva dosis-efecto. Está determinada por la pendiente de la gráfica de efecto mediana. El coeficiente de correlación lineal "r" debe ser mayor o igual a 0,90. Las unidades de concentración de fármacos son arbitrarias.

Los valores del índice de combinación (CI) <0,9 indican sinergismo, los valores de CI 0,9-1,1 indican aditividad y los valores de CI > 1,1 indican antagonismo. La Tabla 4 muestra los valores de CI que corresponden a sinergismo, aditividad y antagonismo.

Tabla 4

20

Índice de combinación (CI)	Descripción
<0,1	Sinergismo muy fuerte
0,1-0,3	Sinergismo fuerte
0,3-0,7	Sinergismo
0,7-0,85	Sinergismo moderado
0,85-0,90	Sinergismo leve
0,90-1,10	Casi aditivo
1,10-1,20	Antagonismo ligero
1,20-1,45	Antagonismo moderado
1,45-3,3	Antagonismo
3,3-10	Antagonismo fuerte
>10	Antagonismo muy fuerte

Cada estudio de combinación se repitió en días separados un total de n=3 veces, a menos que se indique lo contrario, y el valor del índice de combinación promedio se informó con un error estándar de la media (sem).

25 Ejemplo 3

Ensayos ELISA para probar la potencia del fármaco

Las células se colocaron en placas de 6 pocillos por línea celular a $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en 4,5 ml de medio de crecimiento. Las existencias de trabajo de temsirolimus (Wyeth, Madison, Nueva Jersey) se prepararon a una concentración 10X, y luego se valoraron como diluciones en 2 series produciendo curvas de dosis de 10 puntos. Se añadió temsirolimus (0,5 ml) a las células, con concentraciones finales equivalentes a las utilizadas en los estudios de combinación *in vitro* anteriores. Las células tratadas se incubaron 24 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Se recogieron los sedimentos celulares y se prepararon los lisados con el tampón de lisis proporcionado en la proteína ribosomal PathScan Fosfo-S6 (Ser235/236) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling, Beverly, Massachusetts), más inhibidor completo de la proteasa sin EDTA (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se determinaron las concentraciones de proteína y se cargaron 10 µg de extracto de proteína total por muestra en la placa ELISA y se procesaron de acuerdo con las instrucciones. Las placas se leyeron usando el HT Fusion (Perkin Elmer). Los ELISA se realizaron para detectar la cantidad de fosforilación de fosfo-S6 en presencia de temsirolimus en las concentraciones utilizadas en los siguientes estudios de combinación.

Ejemplo 4

Transferencia de Western de los componentes de la ruta de señalización PI3K-AKT-mTOR

45

Los anticuerpos primarios utilizados para medir la señalización de PI3K-AKT-mTOR fueron fosfo-AKT anti-humana (Ser 473) (clon:193H12), AKT anti-humana, fosfo-4E-BP1 anti-humana (Thr37/46), 4E-BP1 anti-humana, proteína ribosomal fosfo-S6 anti-humana (Ser235/236) (clon: 2F9) y proteína ribosomal S6 anti-humana (clon: 54D2) (Cell

Signaling; Beverly, Massachusetts). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron peroxidasa AffiniPure fragmento F(ab')₂ cabra anti-IgG de conejo, fragmento F(ab')₂ específico, y peroxidasa AffiniPure fragmento F(ab')₂ cabra anti-ratón IgG, fragmento Fcy específico (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania). Las transferencias Western se desarrollaron utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico Luminol Enhancer Solution (Thermo Scientific; Rockford, Illinois) y se visualizaron luego de la exposición a la película.

5 Ejemplo 5

Tratamiento combinado con rapalogs en el carcinoma de células renales

10 Se generaron curvas de respuesta a la dosis para ADC h1F6-mcF, temsirolimus sirolimus, everolimus, h1F6-mcF + temsirolimus, h1F6-mcF + sirolimus y h1F6-mcF + everolimus en líneas celulares RCC. En las líneas celulares de RCC 786-O y Caki-2, temsirolimus y sirolimus solos no son fármacos citotóxicos potentes, excepto en la línea celular Caki-2 que se cultiva en medios con bajo FBS. Sin embargo, tanto temsirolimus como sirolimus potencian 15 la citotoxicidad de h1F6-mcF.

Los CI se calcularon para h1F6-mcF + temsirolimus, h1F6-mcF + temsirolimus y h1F6-mcF + everolimus en la línea celular 786-O como se describió anteriormente. La Figura 2 demuestra que h1F6-mcF y MMAE solo son 20 sinérgicos con los rapalogs temsirolimus, sirolimus y everolimus en la línea celular 786-O.

Los CI también se calcularon para h1F6-mcF + temsirolimus y h1F6-mcF + temsirolimus en la línea celular Caki-1 como se describió anteriormente. La Figura 3 demuestra que h1F6-mcF y MMAE solo son sinérgicos con los 25 rapalogs temsirolimus y sirolimus en la línea celular Caki-1.

25 Los resultados que muestran que h1F6-mcF es sinérgico con sirolimus, temsirolimus y everolimus se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

Línea celular	Tratamiento	Exp. n.º	Valores promedio de CI (ED50, ED75, ED90)
786-O	h1F6-mcF + sirolimus	n=3	0,65, 0,51, 0,52
	h1F6-mcF + temsirolimus	n=3	0,41, 0,36, 0,55
	h1F6-mcF + everolimus	n=3	0,45, 0,47, 0,59
	MMAE + sirolimus	n=3	0,51, 0,48, 0,59
	MMAE + temsirolimus	n=3	0,43, 0,38, 0,58
Caki-1	h1F6-mcF + sirolimus	n=3	0,63, 0,55, 0,54
	h1F6-mcF + temsirolimus	n=3	0,37, 0,41, 0,78
	MMAE + sirolimus	n=3	0,65, 0,64, 0,70
	MMAE + temsirolimus	n=3	0,36, 0,40, 0,80
Caki-2	h1F6-mcF + sirolimus	n=3	0,31, 0,53, 1,33
	h1F6-mcF + temsirolimus	n=3	0,11, 0,19, 0,75
	MMAE + sirolimus	n=3	0,38, 0,57, 1,06
	MMAE + temsirolimus	n=3	0,28, 0,51, 1,20

30 Ejemplo 6

Tratamiento combinado con rapalogs en el linfoma Hodgkin y ALCL

35 Los CI se calcularon para cAC10-vcE + temsirolimus, MMAE + temsirolimus y cAC10-vcE + everolimus en la línea celular L540cy como se describió anteriormente. Los CI se calcularon para cAC10-vcE + temsirolimus, MMAE + temsirolimus y cAC10-vcE + sirolimus en las líneas celulares Karpas 299 como se describió anteriormente. La Figura 4 demuestra que cAC10-vcE y MMAE son sinérgicos con los rapalogs temsirolimus y sirolimus.

40 Los resultados que muestran que cAC10-vcE es sinérgico con sirolimus, everolimus y temsirolimus se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

Línea celular	Tratamiento	Exp. n. ^o	Valores promedio de CI (ED50, ED75, ED90)
L540cy (HL tipo T)	cAC10-vcE + temsirolimus	n=3	0,66, 0,50, 0,51
	MMAE + temsirolimus	n=3	0,49, 0,37, 0,40
L540cy (HL tipo T)	cAC10-vcE + everolimus	n=2	0,31, 0,28, 0,38
L428* (HL tipo B)	MMAE + temsirolimus	n=3	0,89, 0,70, 0,56
Karpas-299 (ALCL)	cAC10-vcE + temsirolimus	n=3	0,42, 0,52, 0,82
	MMAE + temsirolimus	n=3	0,45, 0,47, 0,59
Karpas-299 (ALCL)	cAC10-vcE + temsirolimus	n=3	0,45, 0,47, 0,59

* cAC10-vcE no muestra citotoxicidad *in vitro* en la línea celular L428, por lo que no fue posible realizar un estudio combinado.

Ejemplo 7

Tratamiento combinado *in vivo* de cAC10-vcE y temsirolimus en linfoma Hodgkin tipo B

Para probar los tratamientos de combinación en el linfoma Hodgkin tipo B *in vivo*, se utilizó un modelo de xenoinjerto murino. Las células L428 se implantaron en ratones NOD-SCID-gamma (The Jackson Laboratory) para generar tumores. Los tumores se dejaron crecer hasta un promedio de 90 mm³, después se ordenaron en grupos de 7 ratones. Los ratones no fueron tratados, tratados con temsirolimus (20 mg/kg), tratados con cAC10-vcE (1,0 mg/kg), o tratados con cAC10-vcE y temsirolimus. El cAC10-vcE se administró q4dx4 ip. El temsirolimus se administró q4dx4 ip o q3dx6 ip. En el tratamiento de combinación, el cAC10-vcE se administró 2 días antes del temsirolimus. El volumen del tumor se midió periódicamente durante 120 días después de la dosis inicial. Los datos se representaron como una gráfica de Kaplan-Meier que muestra la tasa de triplicado del tumor. Los valores de p se calcularon utilizando la prueba de log-rank para confirmar la significación estadística. Como se puede ver en la Figura 5, cAC10-vcE más temsirolimus tiene una actividad antitumoral significativamente mejor que cualquiera de los tratamientos solos (valor de P = 0,0011 según la prueba Log-Rank).

Tabla 7

Tratamiento	Mediana de los días hasta volumen triple	Combinación vs agente único (valor P)
No tratado	19	
cAC10-vcE	52	p = 0,001
Temsirolimus	56	p = 0,001
cAC10-vcE + Temsirolimus	118	

Ejemplo 8

Tratamiento combinado *in vivo* de cAC10-vcE y everolimus en linfoma Hodgkin tipo B

Para probar los tratamientos de combinación en el linfoma Hodgkin tipo B *in vivo*, se utilizó un modelo de xenoinjerto murino. Las células L428 se implantaron en ratones NOD-SCID-gamma (The Jackson Laboratory) para generar tumores. Los tumores se dejaron crecer hasta un promedio de 90 mm³, después se ordenaron en grupos de 10 ratones. Los ratones no se trataron, se trataron con everolimus (15 mg/kg), se trataron con cAC10 (1 mg/kg), se trataron con cAC10-vcE (1,0 mg/kg), se trataron con cAC10 y everolimus, o tratados con cAC10-vcE y everolimus. El cAC10-vcE y cAC10 se administraron q4dx4 ip. El everolimus se administró q1dx14 po. En el día 61, el brazo de tratamiento combinado de cAC10-vcE y everolimus tiene 10/10 respuestas completas y los brazos de tratamiento único de cAC10-vcE y everolimus no tuvieron respuestas completas.

Ejemplo 9

Tratamiento combinado con rapalogs en el linfoma no Hodgkin

Los CI se calcularon para hBU12-mcF + temsirolimus y hBU12-mcF + sirolimus en la línea celular HT como se describió anteriormente. La Figura 6 demuestra que hBU12-mcF es sinérgica con los rapalogs temsirolimus y sirolimus en la línea celular HT.

Los resultados que muestran que hBU12-mcF es sinérgico con sirolimus, temsirolimus y everolimus se resumen

en la Tabla 8.

Tabla 8

Línea celular	Tratamiento	Exp. n. ^o	Valores promedio de CI (ED50, ED75, ED90)
HT	hBU12-mcF + temsiro.	n=3	0,71, 0,66, 0,64
	hBU12-mcF + sirolimus	n=3	0,77, 0,68, 0,60
	hBU12-mcF + everolimus	n=2	0,54, 0,55, 0,65
Jeko-1	h1F6-mcF + everolimus	n=3	0,91, 0,69, 0,54

5

Ejemplo 10

Tratamiento combinado con inhibidores de PI3K-mTOR de doble especificidad e inhibidores selectivos de mTor

- 10 Los CI se calcularon para h1F6-mcF + BEZ235 en células 786-O, células Caki-1, células Jeko-1 y células Raji-4RH-11; cAC10-vcE + BEZ235 y cAC10-vcE + PP242 en células L540cy (HL); cAC10-vcE + BEZ235 en células Karpas-299; hBU12-mcF + BEZ235 en células HT, y h1F6-mcF + PP242 en células Jeko-1 como se describió anteriormente. La Figura 8 demuestra que NVP-BEZ235 es sinérgico con los ADC de auristatina (como los rapalogs temsirolimus y sirolimus) en múltiples líneas celulares. Se demostraron valores de CI más bajos en las 15 líneas celulares de RCC y NHL (especialmente en ED₉₀), lo que sugiere una mayor sinergia.

Los resultados que muestran que NVP-BEZ235 y PP242 son sinérgicos con los ADC de auristatina se resumen en la Tabla 9.

20 Tabla 9

Línea celular	Tratamiento	Exp. n. ^o	Valores promedio de CI (ED50, ED75, ED90)
786-O	h1F6-mcF + BEZ235	n=3	0,78, 0,63, 0,52
Caki-1	h1F6-mcF + BEZ235	n=3	0,75, 0,68, 0,64
L540cy	cAC10-vcE + BEZ235	n=3	0,68, 0,56, 0,47
	cAC10-vcE + PP242	n=2	0,74, 0,76, 0,79
	MMAE + BEZ235	n=3	0,91, 0,75, 0,63
L428	MMAE + BEZ235	n=3	0,62, 0,59, 0,56
Karpas-299	cAC10-vcE + BEZ235	n=2	0,81, 0,79, 0,78
Raji-4RH-11	h1F6-mcF + BEZ235	n=3	0,91, 0,71, 0,58
HT	hBU12-mcF + BEZ235	n=3	0,59, 0,40, 0,30
Jeko-1	h1F6-mcF + PP242	n=3	0,91, 0,76, 0,66
Jeko-1	h1F6-mcF + BEZ235	n=3	0,72, 0,55, 0,42

Ejemplo 11

25 Tratamiento combinado con inhibidores de P13K y AKT

Los CI se calcularon para h1F6-mcF + MK-2206 en células Jeko-1 y hBU12-mcF y XL147 en células HT.

- 30 Los resultados que muestran que los inhibidores de P13K y AKT son sinérgicos con los ADC de auristatina se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10

Línea celular	Tratamiento	Exp. n. ^o	Valores promedio de CI (ED50, ED75, ED90)
Jeko-1	h1F6-mcF+MK2206	n=3	0,69, 0,54, 0,44
HT	hBU12-mcF+XL147	n= 1	1,08, 0,36, 0,12

Línea celular	Tratamiento	Exp. n. ^o	Valores promedio de C1 (ED50, ED75, ED90)
HT	hBU12-mcF + MK-2206	n=3	1,3, 0,95, 0,75
HT	hBU12-mcF + BKM-120	n=3	0,74, 0,75, 0,79

Ejemplo 12

Ensayos ejemplares

- 5 Un ensayo ejemplar para determinar si un compuesto inhibe PI3K se proporciona en Knight et al (2006) Cell vol. 125 pp. 733-747. Brevemente, los valores de IC50 se miden utilizando un ensayo de TLC estándar para la actividad de la lipido quinasa o un ensayo de captura de membrana de alto rendimiento. Las reacciones de quinasa se realizan preparando una mezcla de reacción que contiene quinasa, inhibidor (concentración final de DMSO al 2 %), tampón (HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM) y fosfatidilinositol recién sonicado (100 µg/ml). Las reacciones se inician mediante la adición de ATP que contiene 10 µCi de γ-32P-ATP hasta una concentración final de 10 o 100 µM. Las reacciones se dejan proceder durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para el análisis de TLC, las reacciones se terminan mediante la adición de 105 µl de HCl 1N seguido de 160 µl de CHCl₃:MeOH (1:1). La mezcla bifásica se agita en vórtex, se centrifuga brevemente y la fase orgánica se transfiere a un nuevo tubo 10 utilizando una punta de pipeta de carga de gel previamente recubierta con CHCl₃. Este extracto se mancha en placas de TLC y se desarrolla durante 3 a 4 horas en una disolución 65:35 de n-propanol:ácido acético 1M. Las placas de TLC se secan, se exponen a una pantalla de phosphorimager (Storm, Amersham) y se cuantifican. Para cada compuesto, la actividad de la quinasa se mide normalmente a 10-12 concentraciones de inhibidor que representan diluciones dobles de la concentración más alta probada (100 µM).
- 15 20 Un ensayo ejemplar para determinar la selectividad de la quinasa (mTORC1/2) es el siguiente. Para determinar la selectividad de un inhibidor de quinasa, el compuesto se prueba contra un panel grande de proteínas quinasas purificadas in vitro (en presencia de ATP 10 uM) a una concentración 100 veces mayor que su valor de IC50 para la inhibición de mTOR (Feldman et al. (2009) PLOS Biology vol. 7 (2) pp. 371-383). Una diferencia en el valor de IC50 de aproximadamente 100 veces o más (para mTOR frente a otras quinasas) indica selectividad. Cada quinasa tiene una proteína única o un sustrato lipídico.
- 25 30 Un ensayo ejemplar para determinar si un compuesto compite con el ATP por la unión utiliza la cinética de Michael-Menten para establecer que el compuesto disminuye la actividad de la enzima quinasa, pero se puede superar aumentando la concentración de sustrato (ATP). La incorporación de ATP radiomarcado (32P-ATP) en un sustrato de quinasa (proteína o péptido) es la lectura del ensayo de quinasa. La valoración del compuesto disminuirá la cantidad de 32P-ATP incorporada en el sustrato. El aumento de la cantidad de ATP presente en el ensayo superará la potencia del compuesto solo si el compuesto es un compuesto competitivo de ATP.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco se administra en terapia combinada con un inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR, en donde el inhibidor de la ruta es un inhibidor de la quinasa PI3K, un inhibidor de AKT, un inhibidor de mTOR del sitio activo o un inhibidor de mTOR del sitio no activo, en donde el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco se une específicamente a un antígeno de célula cancerosa que está en la superficie de una célula cancerosa que demuestra una regulación positiva de la ruta PI3K-AKT-mTOR, y en donde la auristatina es MMAE o MMAF, y el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina y el inhibidor proporcionan un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 1, en donde el cáncer es una neoplasia maligna hematológica, seleccionada del grupo que consiste en linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin y linfoma anaplásico de células grandes.
- 10 3. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR es un inhibidor de mTOR del sitio no activo.
- 15 4. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 3, en donde el inhibidor de mTOR del sitio no activo es sirolimus.
- 20 5. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 3, en donde el inhibidor de mTOR del sitio no activo es un rapalog.
- 25 6. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 5, en donde el rapalog es everolimus, temsirolimus o deforolimus (AP23573).
- 30 7. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR es un inhibidor de mTOR del sitio activo que compite con el ATP por la unión a un sitio de unión de ATP de una subunidad catalítica de mTOR.
- 35 8. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor de la ruta PI3K-AKT-mTOR es un inhibidor de PI3K del sitio activo que compite con el ATP por la unión al sitio de unión de ATP de PI3K catalítica.
9. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que tiene la siguiente fórmula de:



40 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en donde:

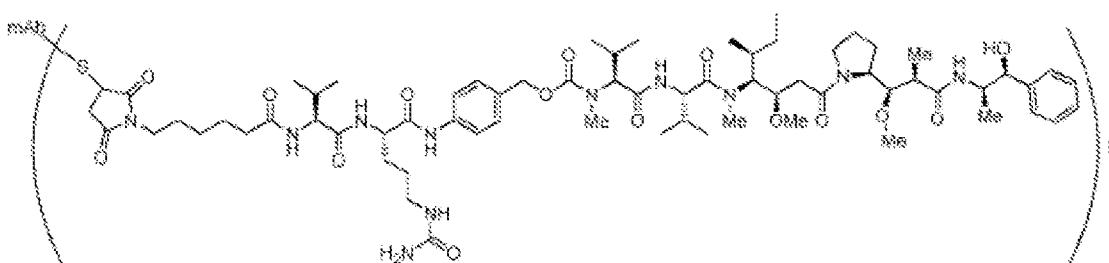
L es el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina que se une específicamente al antígeno de la célula cancerosa que se encuentra en la superficie de las células asociadas con el cáncer;

45 LU- es una unidad ligadora;

D es una unidad de fármaco, en donde la unidad de fármaco es una auristatina que tiene actividad citostática o citotóxica contra las células diana seleccionadas del grupo que consiste en MMAE y MMAF; y

50 el subíndice p es de 1 a 20.

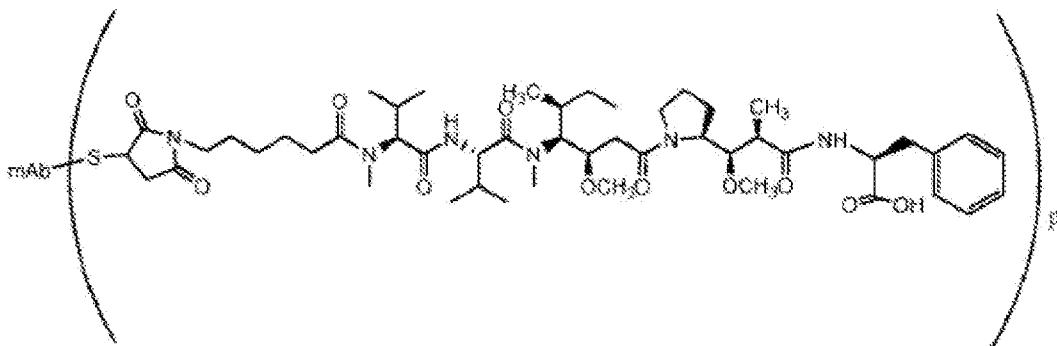
55 10. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 9, que tiene la fórmula de:



o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde mAb es el anticuerpo en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, S es un átomo de azufre del anticuerpo monoclonal, y el subíndice p es de 1 a 8.

5

11. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 9, que tiene la fórmula de:



10

o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde mAb es el anticuerpo, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, S es un átomo de azufre del anticuerpo monoclonal, y el subíndice p es de 1 a 8.

15

12. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 9, 10 u 11, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es una composición que comprende compuestos conjugados anticuerpo-fármaco basados en auristatina, en donde el número promedio de moléculas de auristatina por anticuerpo en la composición es de 2 a 6.

20

13. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el cáncer expresa el antígeno CD70 y el conjugado anticuerpo-fármaco es un conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD70.

25

14. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 13, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD70 es 1F6 humanizado unido covalentemente a mcMMAF.

30

15. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el cáncer expresa el antígeno CD30 y el conjugado anticuerpo-fármaco es un conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD30.

35

16. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 15, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es AC10 químérico unido covalentemente a vcMMAE.

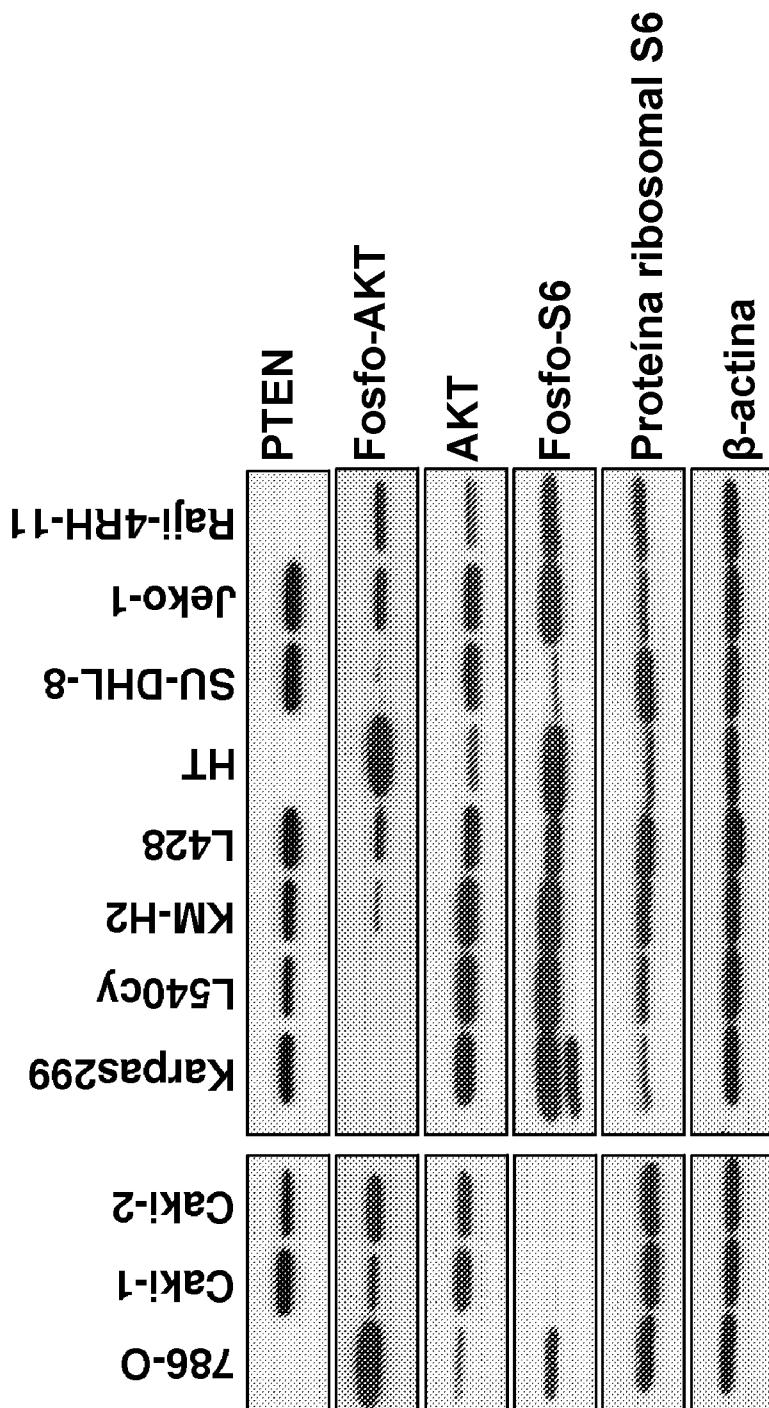
40

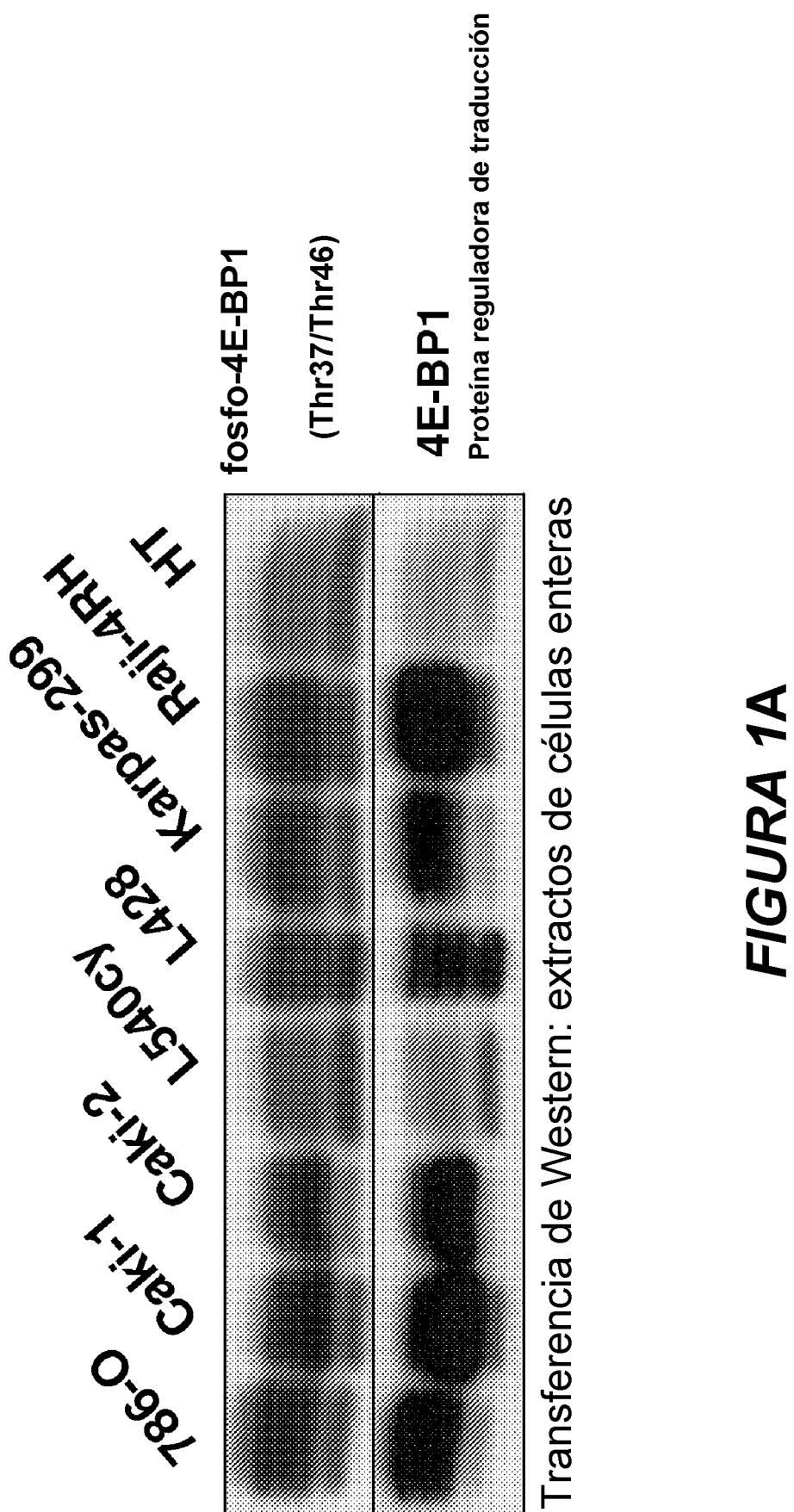
17. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 16, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es brentuximab vedotin.

45

18. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el cáncer expresa el antígeno CD19 y el conjugado anticuerpo-fármaco es un conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina anti-CD19.

19. El conjugado anticuerpo-fármaco a base de auristatina para uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 18, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco es BU12 humanizado unido covalentemente a mcMMAF.

FIGURA 1



h1F6-mcF y MMAE son sinérgicos con Rapalogs

Línea celular de RCC 786-O (n=3)

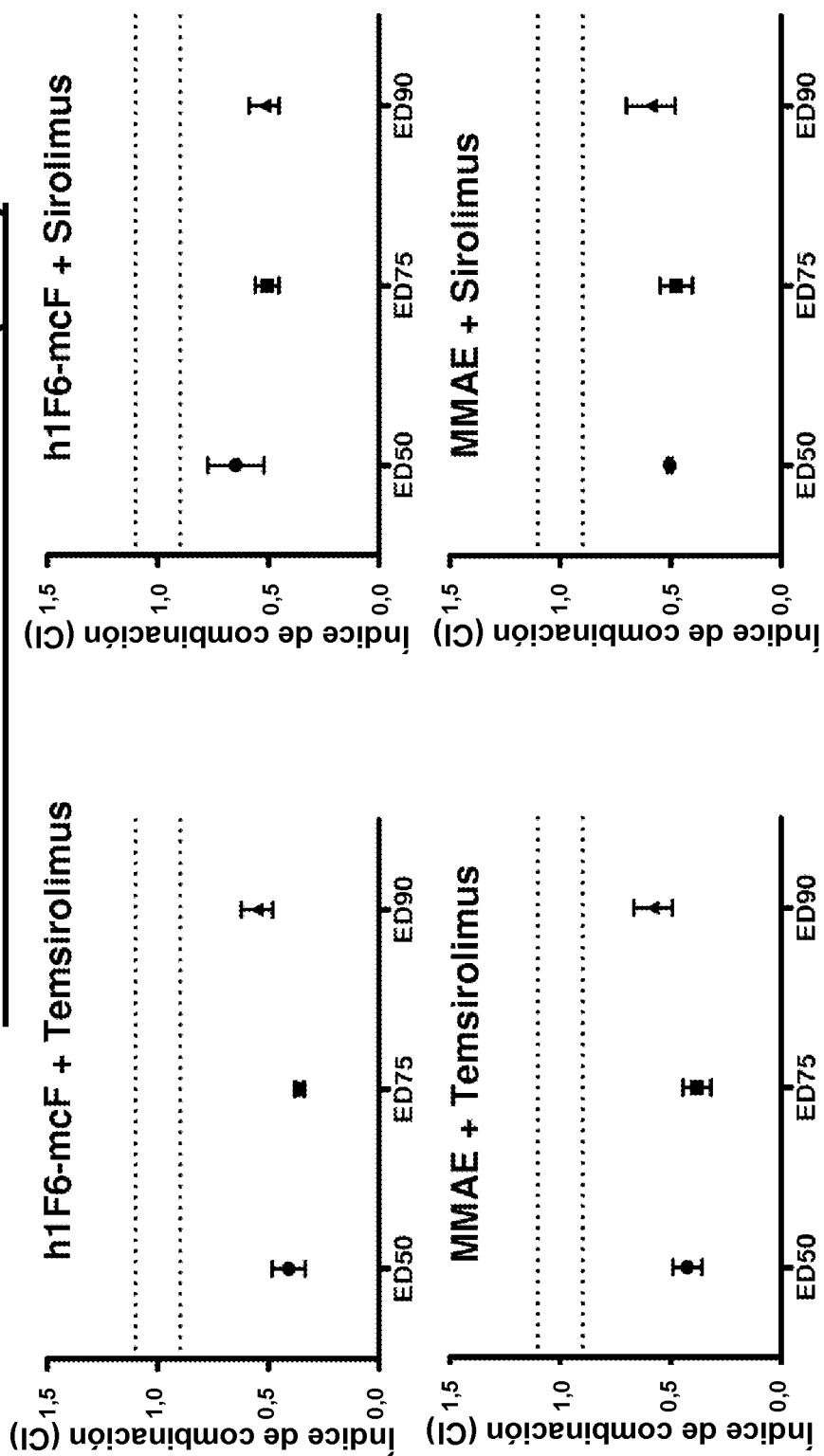


FIGURA 2

h1F6-mcF y MMAE son sinérgicos con Rapalogs

Línea celular de RCC Caki-1 (n=3)

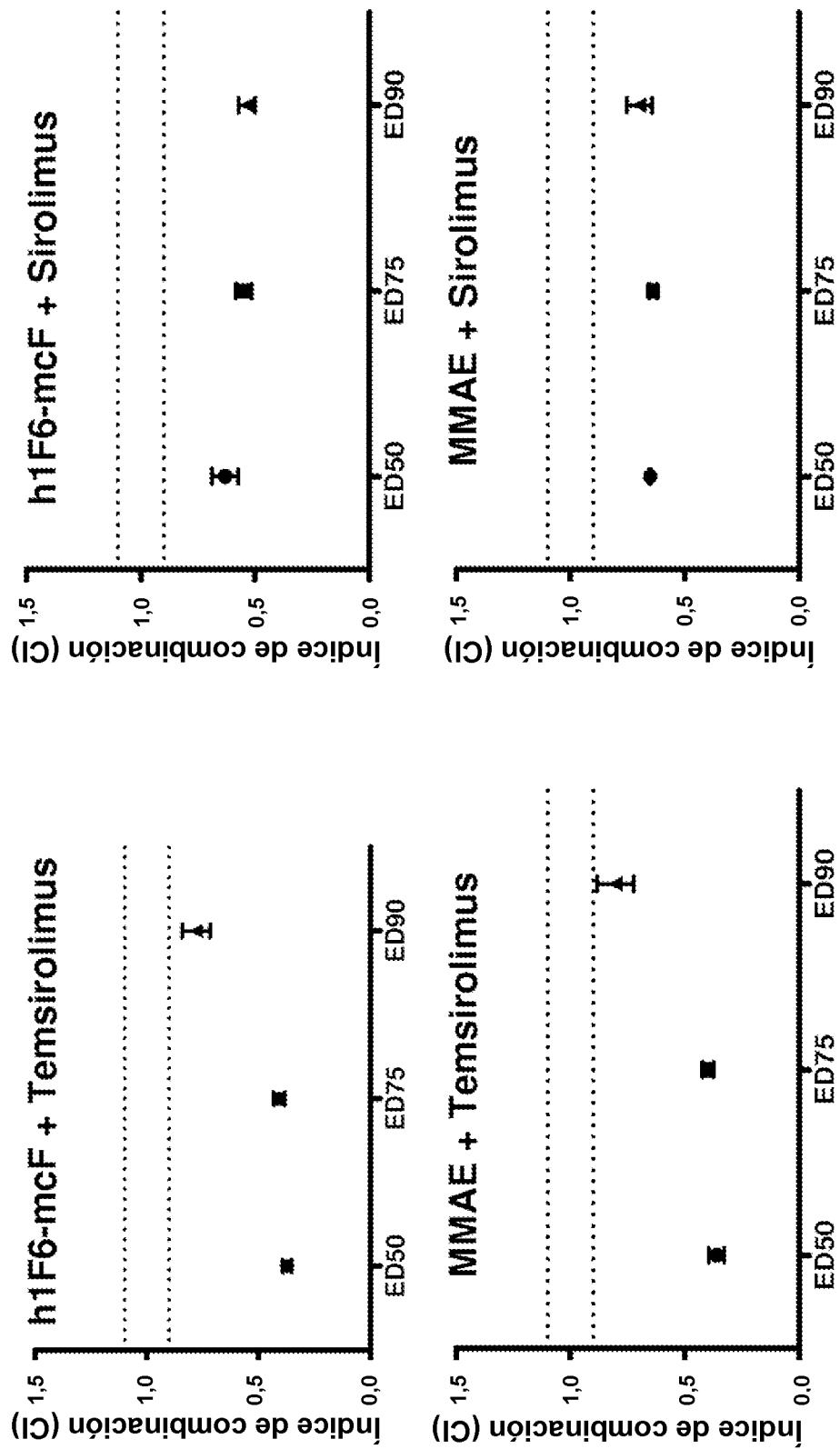
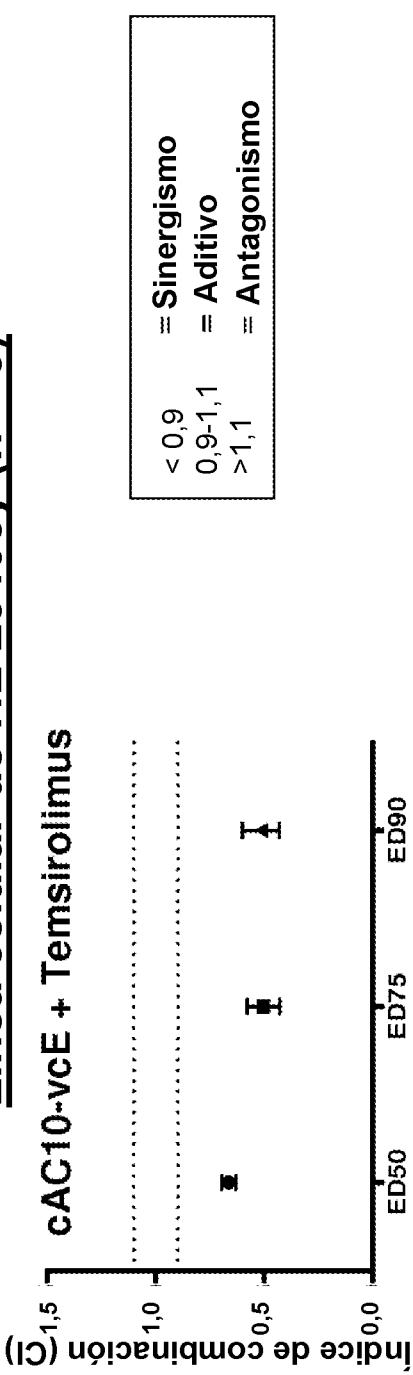


FIGURA 3

cAC10-vCE es sinérgico con rapalogs

Línea celular de HL L540cy (n = 3)



Línea Celular de ALCL Karpas-299 (n=3)

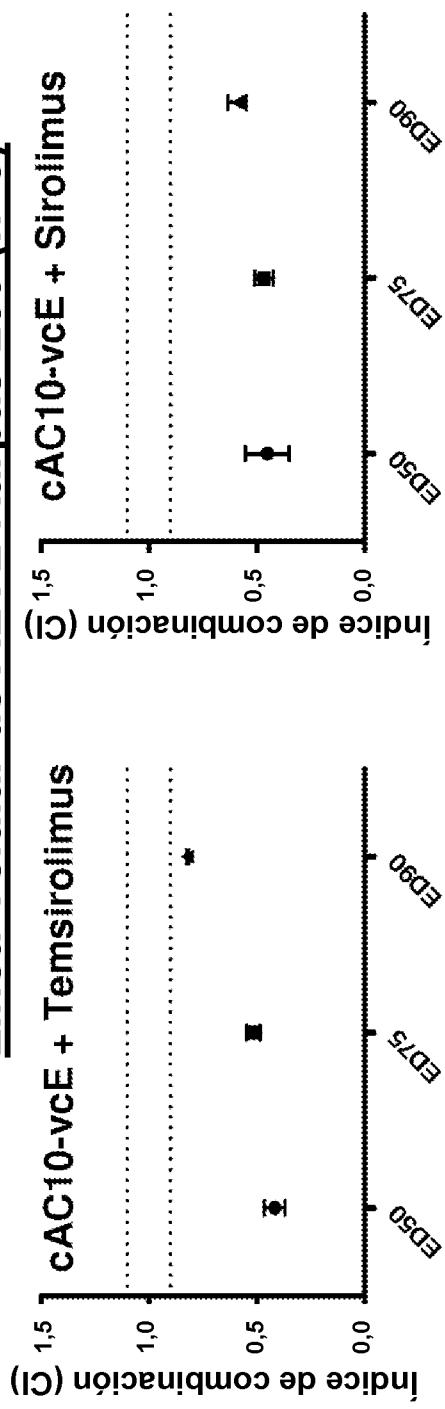


FIGURA 4

cAC10-vCMMAE es sinérgico con Temsirolimus

Modelo de xenoinjerto de linfoma Hodgkin tipo B L428

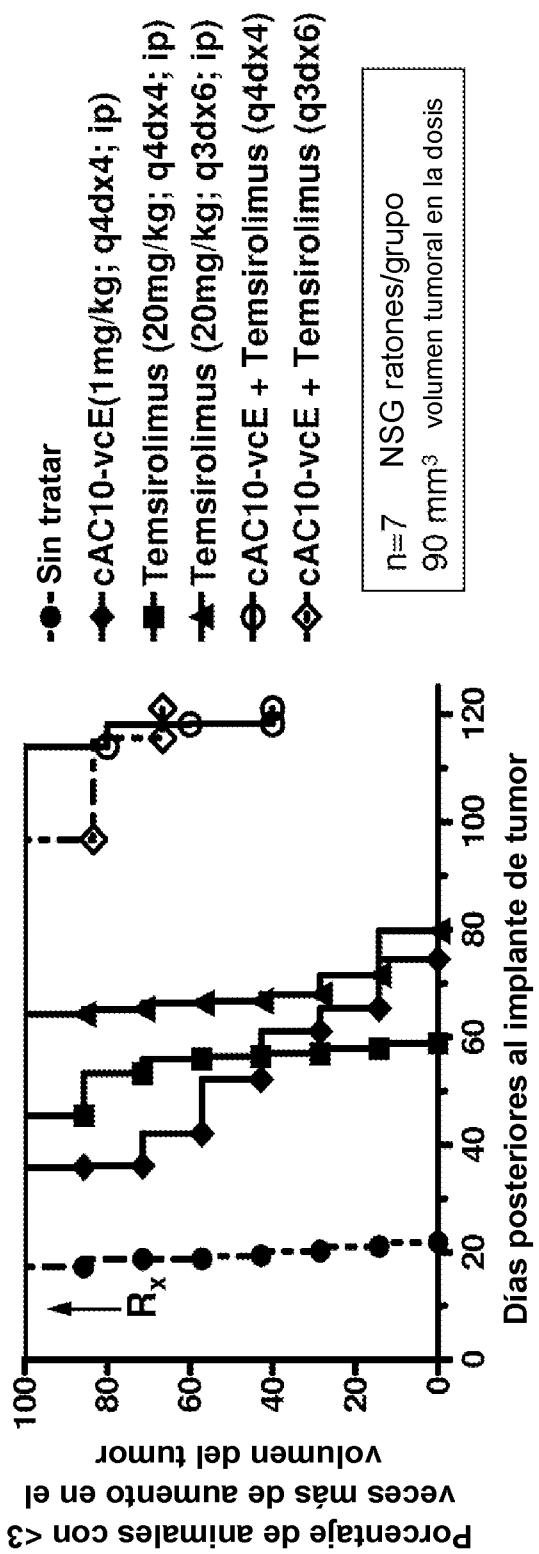


FIGURA 5

cAC10-vclMMAE es sinérgico con Everolimus

Modelo de xenoinjerto de linfoma Hodgkin tipo B L428

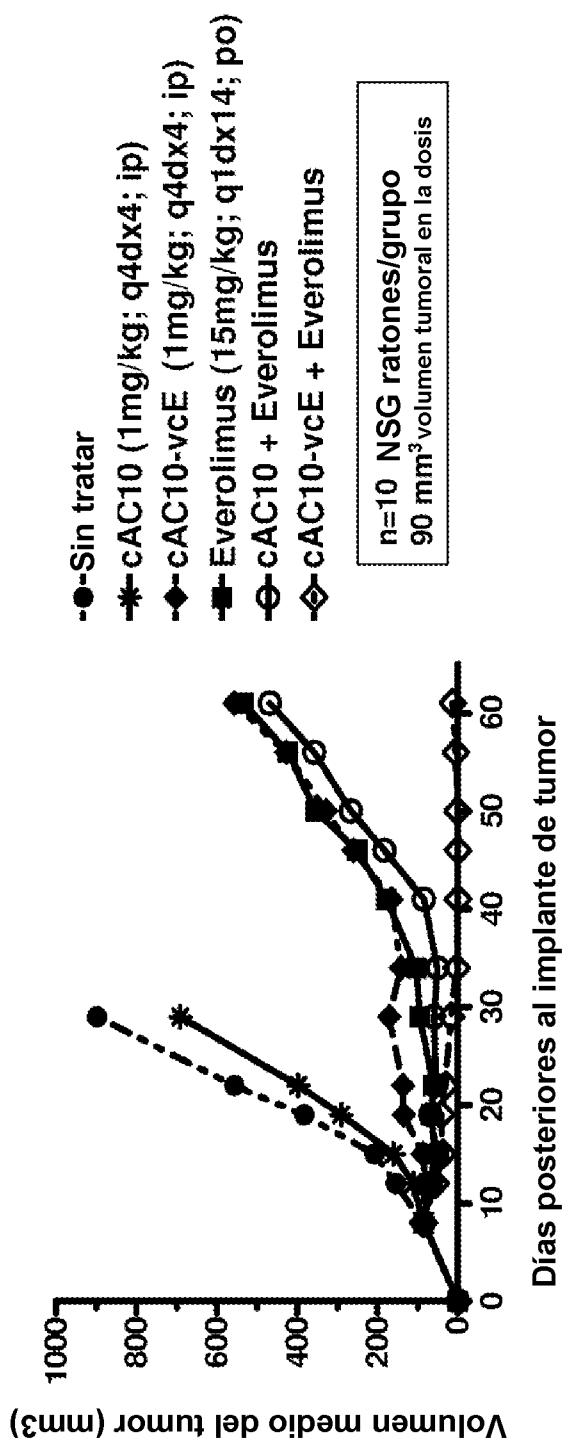


FIGURA 6

hBU12-mcF es sinérgico con Rapalogs

Línea celular de NHL CD19⁺ HT (n=3)

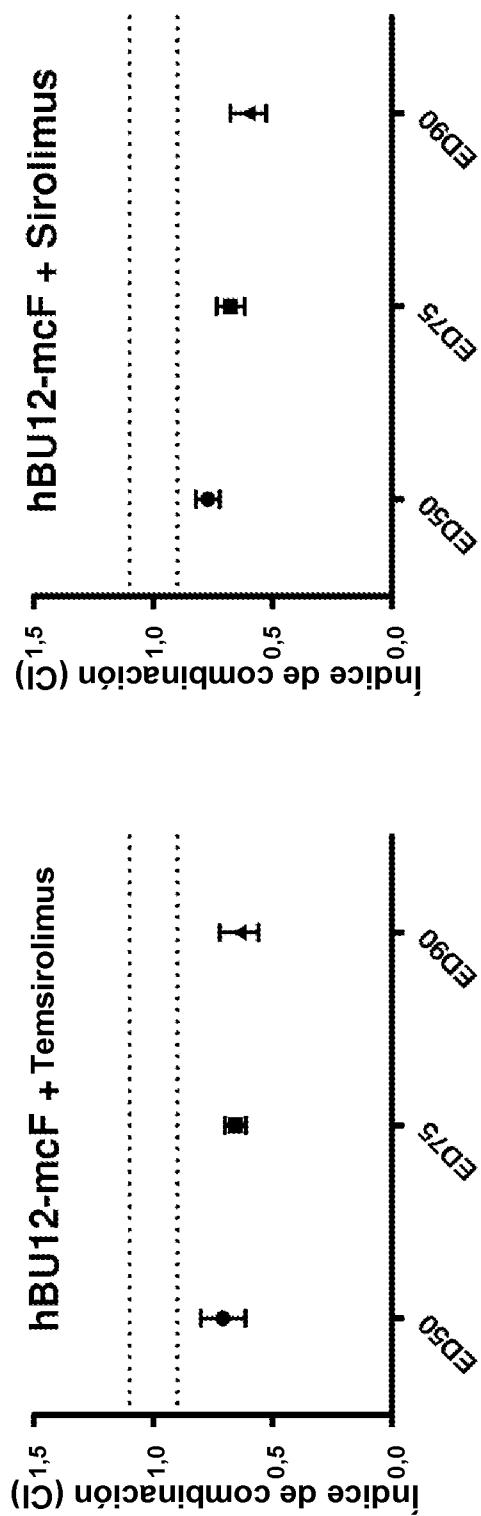


FIGURA 7

NVP-BEZ235 Sinergia con auristatina ADC

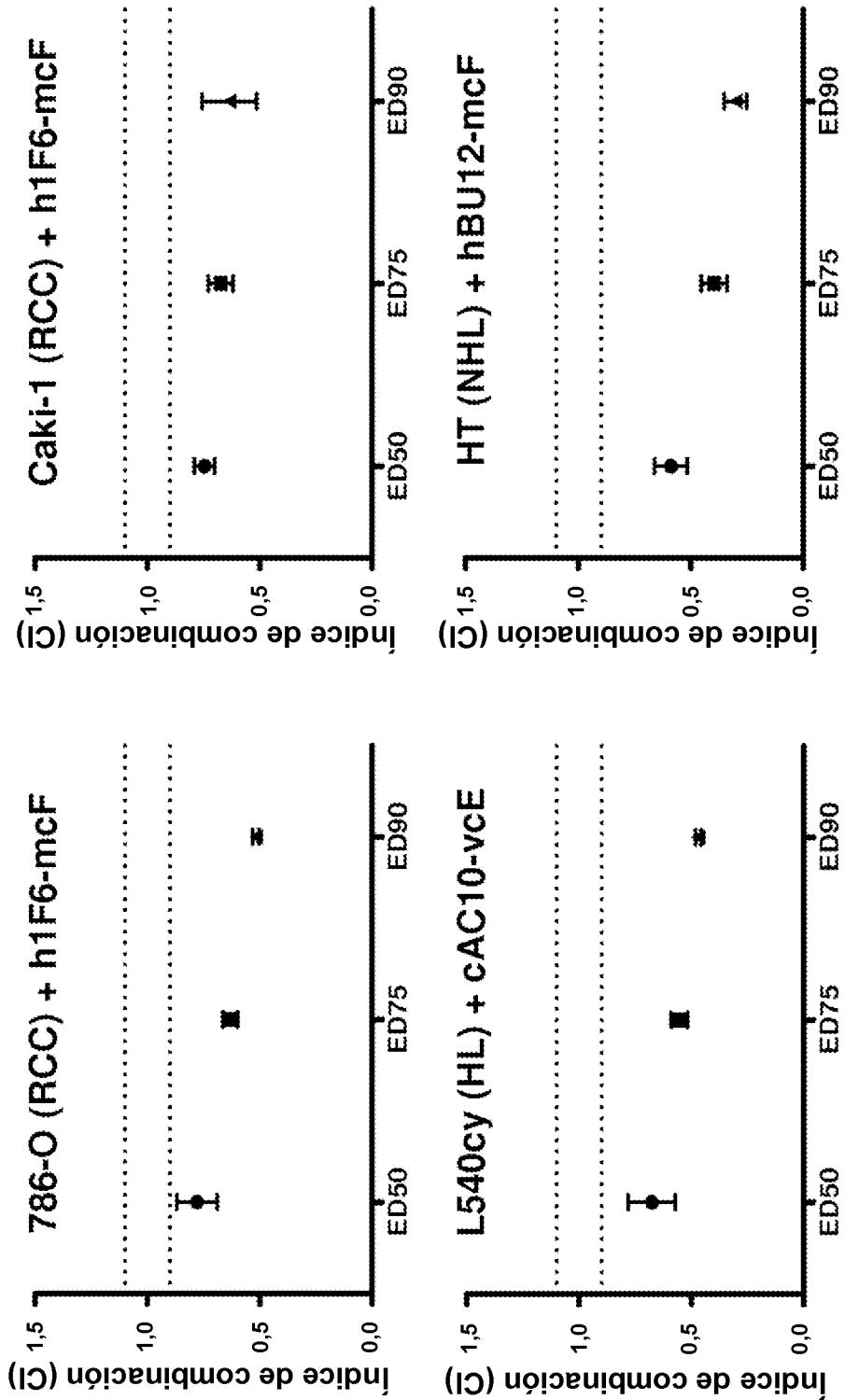


FIGURA 8